



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 7/01, A61K 48/00, C07K 14/075		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/13596 (43) Date de publication internationale: 9 mai 1996 (09.05.96)		
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01415		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).			
(22) Date de dépôt international: 25 octobre 1995 (25.10.95)					
(30) Données relatives à la priorité: 94/13355 28 octobre 1994 (28.10.94) FR					
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>			
(72) Inventeurs; et					
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Écrouves (FR). ORSINI, Cécile [FR/FR]; 19, rue de la Voûte, F-75012 Paris (FR).					
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A.. Direction des Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).					
(54) Title: VIABLE CONTAMINANT PARTICLE FREE ADENOVIRUSES, THEIR PREPARATION AND USE					
(54) Titre: ADENOVIRUS DEPOURVUS DE PARTICULES CONTAMINANTES VIVANTES, PRÉPARATION ET UTILISATIONS					
(57) Abstract					
Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and their use in gene therapy, are disclosed. In particular, recombinant adenoviruses including an adenovirus genome wherein (i) the E1 region is inactivated, (ii) the genomic organisation is modified, and (iii) optional recombination with the producing line genome generates non-viable viral particles, are disclosed.					
(57) Abrégé					
La présente invention concerne de nouveaux vecteurs vitaux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne préférentiellement des adénovirus recombinants comprenant un génome d'adénovirus (i) dont la région E1 est inactivée, (ii) dont l'organisation génomique est modifiée et (iii) dont la recombinaison éventuelle avec le génome de la lignée de production conduit à la génération de particules virales non-viables.					
<p style="text-align: center;">SINGLE RECOMBINATION AND CHROMOSOME BREAKAGE <i>RECOMBINAISON SIMPLE ET FRAGMENTATION CHROMOSOMIQUE</i></p> <p style="text-align: right;">RECOMBINANT (E1⁻E4⁺)</p> <p style="text-align: center;">DOUBLE RECOMBINATION <i>RECOMBINAISON DOUBLE</i></p> <p style="text-align: right;">NON-VIABLE (E1⁻E4⁺)</p> <p style="text-align: right;">RECOMBINANT (E1⁻E4⁻)</p> <p style="text-align: right;">NON-VIABLE (E1⁻E4⁻)</p>					

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

I

ADENOVIRUS DEPOURVUS DE PARTICULES CONTAMINANTES VIABLES,
PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques contenant lesdits vecteurs viraux. Plus particulièrement, la présente invention concerne des adénovirus recombinants comme vecteurs pour la thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Viro. 1 5 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 10 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, 15 différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez 25 large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus ont ainsi été utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans le muscle (Ragot et al., Nature 361 (1993) 647), le foie (Jaffe et al., Nature genetics 1 (1992) 372), le système nerveux (Akli et al., Nature genetics 3 (1993) 224), 30 etc.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes

tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 (E1a et E1b notamment) sont nécessaires à la réPLICATION virale. Les régions E4 et L5 par exemple sont elles impliquées dans la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont 5 contenus dans les régions L1 à L5. Les génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genebank M73260). De même des parties, voire la totalité du génome d'adénovirus de sérotypes différents (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, ceux-ci 10 ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes *in vivo*. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes (β -gal, OTC, α -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de réPLICATION dans la cellule infectée. Ainsi, les 15 constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus déletés des régions E1 (E1a et/ou E1b) et éventuellement E3 au niveau desquelles sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). D'autres constructions comportent une déletion au niveau de la 20 région E1 et d'une partie non essentielle de la région E4 (WO94/12649). Néanmoins, les vecteurs décrits dans l'art antérieur présentent certains inconvénients qui limitent leur exploitation en thérapie génique. En particulier, les lots de virus recombinants du type de ceux décrits dans l'art antérieur peuvent être contaminés par des particules réPLICatives, notamment de type sauvage.

Actuellement, les vecteurs dérivés des adénovirus sont en effet produits dans 25 une lignée de complémentation (lignée 293) dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 contient l'extrémité gauche (environ 11-12%) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation et la région E1, incluant E1a, E1b et une partie de la 30 région codant pour la protéine pIX. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, nécessaire à la réPLICATION. En effet, les adénovirus recombinants E1- peuvent être préparés dans les cellules 293 du fait de la bonne trans-complémentation de la région E1 contenue dans cette lignée. Néanmoins, il existe des zones d'homologie entre la région de l'adénovirus intégrée dans le génome de la lignée et l'ADN du virus recombinant que l'on souhaite produire. De ce fait, au cours de la

production, différents événements de recombinaison peuvent se produire, générant des particules virales réplicatives, notamment des adénovirus de type E1+. Comme indiqué sur la figure 2, il peut s'agir d'un événement simple de recombinaison suivi d'une cassure du chromosome (figure 2A), ou d'une double recombinaison (figure 2B). Ces 5 deux types de modification conduisent à remplacer la partie gauche de l'ADN recombinant, dépourvue d'une région E1 fonctionnelle, par la partie correspondante présente dans le génome de la cellule, qui porte une copie fonctionnelle de la région E1. Par ailleurs, compte tenu des titres élevés de vecteur recombinant produits par la lignée 293 (supérieur à 10^{12}), la probabilité que ces événements de recombinaison 10 aient lieu est élevée. De fait, il a été constaté que de nombreux lots de vecteurs adénoviraux recombinants défectifs étaient contaminés par des particules virales réplicatives.

La contamination par des particules réplicatives constitue un inconvénient important. En effet, la présence de telles particules dans des compositions thérapeutiques induirait *in vivo* une propagation virale et une dissémination incontrôlée, avec des risques de réaction inflammatoire, de recombinaison, etc. Les 15 lots contaminés ne peuvent donc être utilisés en thérapie humaine.

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention décrit en effet de nouvelles constructions permettant la production 20 d'adénovirus recombinants défectifs dépourvus de toute contamination par des particules réplicatives. La présente invention décrit également une méthode pour la production des ces adénovirus recombinants. Elle fournit ainsi de nouveaux vecteurs recombinants défectifs dérivés des adénovirus, particulièrement appropriés pour un usage en thérapie génique, notamment pour le transfert et l'expression de gènes *in vivo*. 25

La présente invention réside plus particulièrement dans la construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant un génome d'adénovirus dont l'organisation génétique est modifiée et dont la recombinaison éventuelle avec le génome de la lignée de production conduit à la génération de particules virales non-replicatives et/ou non-viables. La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible 30 de modifier l'organisation génomique de l'adénovirus pour éviter la production de particules réplicatives lors de la production des stocks.

Un premier objet de la présente invention concerne donc un adénovirus recombinant comprenant un génome d'adénovirus (i) dont la région E1 est inactivée, (ii) dont l'organisation génomique est modifiée et (iii) dont la recombinaison éventuelle avec le génome de la lignée de production conduit à la génération de particules virales non-viables.

Au sens de la présente invention, on entend par organisation génétique ou génomique l'agencement des différents gènes ou régions fonctionnelles présents dans le génome de l'adénovirus sauvage, tel que représenté sur la figure 1. Une organisation génétique ou génomique modifiée correspond donc à un génome dans lequel certains gènes ou certaines régions ne sont pas à leur position d'origine. Ainsi, certains gènes ou certaines régions peuvent être déplacées du génome et insérées en un autre site. Il est également possible d'insérer en un site particulier un gène ou une région donnés, et de supprimer ou d'inactiver la région d'origine (par mutation, délétion, insertion, etc).

Le terme particule virale non-viable désigne au sens de l'invention un adénovirus incapable de répliquer son ADN et/ou de se propager de façon autonome dans les cellules infectées. Une particule virale non-viable possède donc un génome d'adénovirus dépourvu au moins de séquences nécessaires à sa réplication et/ou sa propagation dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences. Les séquences nécessaires à la réplication et/ou la propagation sont par exemple la région E1, la région E4 ou la région L5. Plus particulièrement, s'agissant de la région E4, les gènes importants sont les gènes ORF3 et ORF6.

La demanderesse a plus particulièrement montré qu'il est possible de déplacer une fonction essentielle à la réplication ou à la propagation virale sans affecter les propriétés de l'adénovirus comme vecteur de thérapie génique, à savoir son haut pouvoir d'infection des cellules, notamment humaines, et sa capacité à transférer efficacement une gène d'intérêt dans lesdites cellules. Ainsi, dans un mode préféré, la présente invention a pour objet des adénovirus recombinants dont une région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale est présente dans une position génomique autre que sa position d'origine. Avantageusement, cette région se situe au niveau ou à proximité d'une autre région génomique rendue non fonctionnelle.

Les vecteurs de l'invention sont particulièrement avantageux puisqu'ils permettent l'incorporation de gènes d'intérêt de grande taille et qu'ils peuvent être

produits à des titres élevés, sans production de particule virale réplicative contaminante.

Dans les vecteurs de l'invention, la région E1 ou tout autre région peut être
5 inactivée ou rendue non fonctionnelle par différentes techniques connues de l'homme
du métier, et notamment par suppression, substitution, déletion, et/ou addition d'une
ou plusieurs bases. De telles modifications peuvent être obtenues *in vitro* (sur de
l'ADN isolé) ou *in situ*, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique, ou
encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. La ou lesdites modifications
10 génétiques peuvent être localisées dans une partie codante de la région, ou en dehors
d'une région codante, et par exemple dans les régions responsables de l'expression
et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits gènes. L'inactivation peut donc se
manifester par la production de protéines inactives en raison de modifications
structurales ou conformationnelles, par l'absence de production, par la production de
15 protéines ayant une activité altérée, ou encore par la production de protéines naturelles
à un niveau atténué ou selon un mode de régulation désiré.

Parmi les agents mutagènes utilisables pour l'inactivation, on peut citer par
exemple les agents physiques tels que les rayonnements énergétiques (rayons X, γ ,
ultra violet, etc..), ou les agents chimiques capables de réagir avec différents
20 groupements fonctionnels des bases de l'ADN, et par exemple les agents alkylants
[éthylméthane sulfonate (EMS), N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-
nitroquinoléine-1-oxyde (NQO)], les agents bialkylants, les agents intercalants, etc.

Les modifications génétiques peuvent également être obtenues par disruption
génique, par exemple selon le protocole initialement décrit par Rothstein [Meth.
25 Enzymol. 101 (1983) 202]. Dans ce cas, tout ou partie de la séquence codante est
préférentiellement perturbée pour permettre le remplacement, par recombinaison
homologue, de la séquence génomique par une séquence non fonctionnelle ou
mutante.

Préférentiellement, dans les adénovirus de l'invention, la région concernée est
30 inactivée par mutation et/ou déletion d'une ou de plusieurs bases. Encore plus
préférentiellement, elle est inactivée par déletion totale ou partielle.

Plus particulièrement, on entend par déletion toute suppression de tout ou
partie du gène considéré. Il peut s'agir notamment de tout ou partie de la région
codante dudit gène, et/ou de tout ou partie de la région promotrice de la transcription
35 dudit gène. La suppression peut être effectuée par digestion au moyen d'enzymes de

restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques classiques de biologie moléculaire, ainsi qu'illustré dans les exemples.

De manière particulièrement préférée, l'inactivation des gènes est réalisée de telle sorte qu'elle n'affecte que le gène considéré et pas les autres gènes viraux, 5 notamment les gènes voisins. Par ailleurs, certaines altérations telles que des mutations ponctuelles étant par nature capables d'être corrigées ou atténuées par des mécanismes cellulaires, il est particulièrement préféré que l'inactivation soit parfaitement stable ségrégationnellement et/ou non-réversible.

Dans le cas d'inactivation par délétion totale ou partielle, la région essentielle 10 à la viabilité virale se situe préférentiellement au niveau ou à proximité du site de délétion. Il est cependant possible d'utiliser d'autres sites d'insertion, comme par exemple des sites de restriction déjà présents dans le génome sauvage. A cet égard, on préfère néanmoins que l'insertion soit réalisée au moins à proximité du site de délétion, c'est-à-dire en dehors du site de délétion, mais suffisamment prêt pour qu'il ne puisse 15 pas se produire d'événements de recombinaison dans l'intervalle séparant le site de délétion et le site d'insertion. De préférence, la distance entre le site de délétion et le site d'insertion ne devrait pas excéder 50 pb.

Dans un mode préféré de la présente invention, la région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale est déplacée pour être incluse au niveau de la 20 région E1 inactivée et/ou de la région E3.

Selon un mode particulièrement avantageux, dans les adénovirus recombinants de la présente invention, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment PvuII-BglII allant du nucléotide 454 au nucléotide 3328, sur la séquence de 25 l'adénovirus Ad5. Cette séquence est accessible dans la littérature et également sur base de données (voir notamment Genebank n° M73260). Dans un autre mode de réalisation préféré, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment HinfII-Sau3A allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446.

30 La région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale selon la présente invention est avantageusement choisie parmi tout ou partie de la région E4 et/ou de la région pIX-IVa2 et/ou de la région L5, etc.

Dans un mode tout particulièrement préféré de la présente invention, la région essentielle est constituée de tout ou une partie fonctionnelle de la région E4 et elle est insérée au niveau ou à proximité du site de délétion de E1. Selon ce mode de réalisation, la région E4, essentielle à la propagation virale, est insérée dans un position autre que sa position d'origine, de sorte que cette région soit absente dans toute construction qui résulterait de la recombinaison avec le génome de la lignée de production (Cf figure 3). La présente invention a donc également pour objet un adénovirus recombinant dont le génome est caractérisé par la présence de régions E1 et E4 inactivées, et en ce que tout ou une partie fonctionnelle de la région E4 est insérée au niveau ou à proximité de la région E1.

Un tel vecteur adénoviral comprend préférentiellement deux ITR, une région d'encapsidation, une délétion dans la région E1 au niveau de laquelle est insérée tout ou une partie fonctionnelle de E4, et une région E4 d'origine inactivée.

La région E4 est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des mutants dépourvus de E4 sont incapables de se propager. E4 constitue ainsi une région essentielle à la réplication et/ou propagation virale. Cette région E4 est constituée de 7 phases ouvertes de lecture, désignées ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 et ORF6/7 (figure 4). Parmi celles-ci, ORF3 et ORF6 sont les deux gènes essentiels à la propagation virale. Chacun de ces gènes est capable d'induire la propagation virale. En revanche, l'inactivation de la région E4 implique l'inactivation de ORF3 et ORF6.

Dans un mode particulier, dans les vecteurs de l'invention, la totalité de la région E4 est insérée au niveau ou à proximité du site de délétion E1. Il peut s'agir en particulier d'un fragment MaeII-MscI correspondant aux nucléotides 35835-32720.

Dans un autre mode particulier, seule une partie fonctionnelle de E4, c'est-à-dire suffisante pour permettre la propagation virale, est insérée. Cette partie comprend au moins un gène ORF3 ou ORF6 fonctionnel. Préférentiellement, la partie fonctionnelle de E4 est constituée essentiellement de ORF3 ou ORF6. A titre d'exemple, ces phases codantes peuvent être isolées de la région E4 sous forme de fragments PvuII-AluI et BglIII-PvuII respectivement, correspondant aux nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 respectivement.

Avantageusement, la région E4 ou la partie fonctionnelle de cette région comprend également un région promotrice de la transcription. Il peut s'agir du promoteur de la région E4 ou de tout autre promoteur fonctionnel, tel que les promoteurs viraux (E1a, SV40, LTR-RSV, etc), eucaryotes ou mammifère.

5 Préférentiellement, le promoteur utilisé est le promoteur de la région E4.

Comme indiqué ci-dessus, la partie fonctionnelle de E4 insérée au niveau de E1 ne correspond pas nécessairement à la partie de E4 déletée dans la position d'origine. Ainsi, la région initiale peut être inactivée par mutation ponctuelle (sans délétion) et une région E4 fonctionnelle insérée au niveau de E1. De même, la région
10 E4 initiale peut être entièrement déletée et seulement une partie fonctionnelle insérée au niveau de E1.

L'inactivation de la région E4 implique au sens de l'invention l'inactivation fonctionnelle au moins des régions ORF3 et ORF6. Ces régions d'origine peuvent être inactivées par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, toutes les méthodes données ci-dessus peuvent être appliquées à l'inactivation de ORF3 et ORF6 ou toute région supplémentaire de E4. A titre d'exemple, la délétion de la région E4 du virus Ad2 dl808 ou des virus Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014 peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention (Cf exemple 3.).

Ces adénovirus peuvent être obtenus par exemple par co-transfection dans une lignée de production d'un premier plasmide portant la partie gauche du génome du virus que l'on souhaite produire (possédant une délétion dans la région E1 au niveau ou à proximité de laquelle est insérée au moins une partie fonctionnelle de E4) et un fragment d'ADN génomique viral apportant la partie droite du génome du virus (possédant une région E4 inactivée). Après recombinaison, les virus produits sont amplifiés et isolés. Ces adénovirus peuvent aussi être obtenus par permutation des extrémités du génome, comprenant les ITR plus la région contigüe. A cet égard, l'invention a également pour objet un adénovirus recombinant caractérisé en ce que son génome possède une région E1 inactivée et en ce que l'extrémité gauche, comprenant l'ITR et la région d'encapsidation, et l'extrémité droite, comprenant l'ITR et tout ou une partie fonctionnelle de la région E4, sont permutes. Plus particulièrement, l'extrémité gauche comprenant l'ITR gauche et la région d'encapsidation est contenue dans les 382 premiers nucléotides du génome de l'adénovirus Ad5 (par exemple jusqu'au site Hinfl). De même, l'extrémité droite comprenant l'ITR droite et tout ou une partie fonctionnelle de la région E4, y compris

le promoteur de la région E4, est contenue dans les 3215 derniers nucléotides du génome de l'adénovirus Ad5 (par exemple à partir du site MscI en position 32720). Les techniques de l'homme du métier permettent de construire un virus recombinant selon l'invention dans lequel l'ITR droite et tout ou partie de la région E4 sont maintenant situées à la gauche du virus, suivies de la région 3446-32720 du génome de l'adénovirus Ad5, puis de la séquence d'encapsidation et de l'ITR gauche qui devient maintenant l'extrémité droite du virus recombinant (Cf figure 5). Le génome de l'adénovirus recombinant ainsi obtenu est particulièrement avantageux puisque la région essentielle E4 déplacée à gauche est maintenue dans son environnement naturel et donc dans des conditions d'activité optimales pour un cycle infectieux à haut titre. De plus, cette région précède maintenant la région dont la présence dans le génome de la lignée de production 293 était à l'origine de l'apparition de particules viables.

Dans un autre mode tout particulièrement préféré de la présente invention, la région essentielle est constituée de la région codant pour les protéines pIX et IVa2 et elle est insérée au niveau de la région E3, éventuellement en remplacement de séquences déletées (Cf figure 6). Plus particulièrement, la région codant pour les protéines pIX et IVa2 est comprise dans un fragment BglII-NruI correspondant aux nucléotides 3328 à 6316 sur la séquence de l'adénovirus Ad5 sauvage. Dans ce mode de réalisation, la recombinaison éventuelle de l'adénovirus recombinant avec la région de l'adénovirus intégrée dans la lignée de production ne génère que des particules virales non-viables car déletées des principaux gènes tardifs essentiels à la viabilité.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, deux régions essentielles du génome de l'adénovirus sont déplacées de leurs positions d'origine. Plus préférentiellement, ces régions essentielles sont représentées par la région codant pour la protéine pIX et la région codant pour tout ou seulement une partie fonctionnelle de la région E4. Selon un mode préféré, elles seront déplacées au niveau de la région E1, en remplacement de séquence déletées et en conservant ou non l'orientation de leur cadre de lecture.

A titre illustratif de ce type de construction on peut plus particulièrement se rapporter à la construction représentée en figure 8. Dans cette construction, la région codant pour la protéine pIX est déplacée dans la région E1 déletée, à droite de l'ITR gauche devenu extrémité droite du virus recombinant. La région codant pour la protéine pIX y est en outre placée en lecture inverse. En ce qui concerne la région

essentielle de E4, elle y est représentée par les gènes ORF3-ORF6/7, sous contrôle du promoteur E4, et y est insérée également au niveau du site de délétion de E1, entre la région codant pour la protéine pIX et la région codant pour la protéine IVa2 dont la position n'a pas été affectée; dans le cas de la construction spécifique de la figure 8, les deux régions codant respectivement pour la protéine pIX et la protéine IVa2 possèdent des sites de polyadénylation distincts.

Une telle construction est particulièrement avantageuse sur le plan de la fiabilité et innocuité. En effet, toute recombinaison parasitaire entre 2 molécules virales de ce type, au niveau de la région E4 par exemple, conduira à un virus recombinant démunie de sa séquence d'encapsidation. De même, une recombinaison entre une telle molécule virale avec la région complémentaire dudit adénovirus, intégrée dans une lignée cellulaire de production, ne générera que des particules virales délestées de leurs principaux gènes tardifs, essentiels à leur viabilité.

Comme indiqué précédemment, les adénovirus recombinants selon l'invention comprennent avantageusement les séquences ITR et une région permettant l'encapsidation.

Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réPLICATION des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire à l'encapsidation du génome viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus sauvages, entre l'ITR gauche et le gène E1 (Cf figure 1). Dans les adénovirus de l'invention, elle peut être localisée à côté de l'ITR gauche comme de l'ITR droite (cf figure 5). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidique de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi

que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, une séquence d'encapsidation fonctionnelle est comprise entre les nucléotides 194 et 358 du génome.

5 Par ailleurs, les adénovirus selon l'invention peuvent posséder d'autres altérations au niveau de leur génome. En particulier, d'autres régions peuvent être déletées pour augmenter la capacité du virus et réduire ces effets secondaires liés à l'expression de gènes viraux. Ainsi, tout ou partie de la région E3 notamment peut être déletée.

10 Des adénovirus recombinants selon l'invention possèdent des propriétés particulièrement attractives pour une utilisation en thérapie génique. Ces vecteurs combinent en effet des propriétés d'infection, de sécurité et de capacité de transfert de gènes très élevées.

15 Avantageusement, les adénovirus recombinants de l'invention comportent en outre une séquence d'acides nucléiques hétérologue dont le transfert et/ou l'expression dans une cellule, un organe ou un organisme est recherché.

20 En particulier, la séquence d'ADN hétérologue peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques. Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

25 Il peut s'agir en particulier de gènes codant pour des produits protéiques ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, un acide aminé, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, 30 ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; 5 facteurs apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, 10 cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 15 140 308.

Le gène thérapeutique peut aussi être un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation de vaccins 20 permettant d'immuniser l'homme, notamment contre des microorganismes ou des virus. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend 25 également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une 30 région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes

eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En 5 outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique hétérologue ne comporte pas de séquences promotrices, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

10 Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

20 La cassette d'expression du gène thérapeutique peut être insérée en différents sites du génome de l'adénovirus recombinant selon l'invention. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Dans ce cas, elle est localisée à côté (en 5' ou en 3') de la région ou de la partie fonctionnelle de E4. Elle peut également être insérée au niveau de la région E3, en addition ou en substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 inactivée.

25 Toujours dans un mode particulièrement avantageux, les vecteurs de l'invention possèdent en outre un gène E3 fonctionnel sous contrôle d'un promoteur hétérologue. Plus préférentiellement, les vecteurs possèdent une partie du gène E3 permettant l'expression de la protéine gp19K. Cette protéine permet en effet d'éviter que le vecteur adénovirus fasse l'objet d'une réaction immunitaire qui (i) limiterait son action et (ii) pourrait avoir des effets secondaires indésirables.

30 Les adénovirus recombinants selon l'invention peuvent être d'origines diverses. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. De ce fait, les enseignements décrits dans la présente demande peuvent être aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Plus particulièrement, les adénovirus de l'invention peuvent être d'origine humaine, animale, ou mixte (humaine et animale).

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés (Cf demande FR 93 05954). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation *in vivo*, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340); l'adénovirus porcin 5359, ou les adénovirus simiens tels que notamment les adénovirus référencée à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine

canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., J. Gen. Virol. 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés et séquencés (voir notamment Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241; Linné, Virus Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfacter l'ADN du virus recombinant (défectif) préparé *in vitro* dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentation du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui réduit les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire. Dans le cas d'adénovirus dans lesquels seule la région E1 est déficiente, la lignée préférée est la lignée 293.

Une seconde approche consiste à co-transfacter dans une lignée cellulaire appropriée l'ADN du virus recombinant défectif préparé *in vitro* et l'ADN d'un ou de plusieurs virus ou plasmide helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de complémenter toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces fonctions est en effet complémentée par le ou les virus helper. Ce ou ces virus helper sont eux-mêmes défectifs. La préparation d'adénovirus recombinants défectifs de l'invention selon cette méthode est également illustrée dans les exemples.

A cet égard, la présente demande décrit également la construction de plasmides portant la partie gauche modifiée du génome de l'adénovirus Ad5 (plasmides de la série pCO1-E4 par exemple). Ces plasmides sont particulièrement utiles pour la construction d'adénovirus recombinants en tant que vecteurs de thérapie génique. Ainsi, les plasmides pCO1-E4 portent la région gauche du génome de l'adénovirus, depuis l'ITR gauche jusqu'au nucléotide 6316, avec une délétion de la région comprise entre les nucléotides 382-3446, correspondant au locus E1, au niveau de laquelle est insérée tout ou une partie fonctionnelle de E4. Les plasmides pCO1-E4 contiennent par ailleurs un multisite de clonage permettant l'incorporation d'une séquence d'acides nucléiques hétérologue d'intérêt. Les plasmides pCO1-E4 peuvent être utilisés pour

préparer l'adénovirus recombinant défectif par cotransfection avec un ADN, préférentiellement d'origine virale, correspondant à la partie droite du génome de l'adénovirus possédant une région E4 inactivée, dans une lignée cellulaire compétente. En ce qui concerne ce dernier, il peut être issu du génome d'un virus défectif tel que Ad2 dl808 qui est déleté de la région E4 (Weinberg et al., J. Virol. 57 (1986) 833), 5 Ad5 dl1004; Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014, etc (Cf exemples). A cet égard, Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014, etc (Cf exemples). A cet égard, l'invention concerne également un procédé de préparation d'adénovirus recombinants dépourvus de particules réplicatives selon lequel on co-transfète une lignée cellulaire compétente avec

10 - un premier ADN comprenant la partie gauche du génome dudit adénovirus, possédant une délétion dans la région E1 au niveau ou à proximité de laquelle est insérée au moins une partie fonctionnelle de la région E4, et

15 - un second ADN comprenant au moins la partie droite du génome dudit adénovirus, possédant une région E4 inactivée, et une partie d'adénovirus commune avec le premier ADN,

et on récupère les adénovirus produits par recombinaison homologue entre lesdits ADN.

20 Parmi les lignées cellulaires utilisables, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Comme indiqué précédemment, cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12%). Avantageusement, dans le procédé de l'invention, le premier ADN est choisi parmi les plasmides de type pCO1-E4.

25 Par ailleurs, pour préparer un adénovirus recombinant comprenant un gène thérapeutique, le premier ou le second ADN mis en oeuvre dans le procédé de l'invention porte en outre une séquence d'ADN hétérologue d'intérêt.

Ensuite, les virus recombinants qui se sont multipliés sont récupérés, purifiés et amplifiés selon les techniques classiques de la virologie.

30 Les plasmides pCO1-E4 permettent ainsi la construction d'adénovirus recombinants portant une délétion dans la région E1 allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446, au niveau de laquelle tout ou une partie fonctionnelle de E4 est insérée, ainsi éventuellement qu'un gène thérapeutique.

35 La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits

précédemment. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de serum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherché. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Selon la séquence d'ADN hétérologue insérée, les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose cystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéinémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

- Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.
- Figure 2 : Événements de recombinaison entre l'adénovirus et la lignée 293.
- 5 Figure 3 : Représentation d'un type de vecteurs de l'invention, et de sa recombinaison avec la lignée 293.
- Figure 4 : Organisation de la région E4
- Figure 5 : Représentation d'un adénovirus de l'invention aux extrémités permutées. E4+ désigne une région E4 fonctionnelle; ΔE4 désigne une région E4 non-fonctionnelle, ψ désigne une séquence d'encapsidation. La cassette d'expression du gène d'intérêt n'est pas représentée mais peut être insérée comme indisposé dans le texte.
- 10 Figure 6 : Représentation d'un type de vecteurs de l'invention (pIX-IVa2). pIX+IVa2 contient au moins une région IVa2 fonctionnelle. ΔE1ΔpIX désigne une délétion des séquences de l'adénovirus comprise entre la région Ψ et la fin de la région codant pour la protéine 140kD (position 5200) de la région E2. Cette délétion inclue également la région IVa2 et concerne la séquence présente dans le chromosome de la lignée 293 en aval de la région E&b.
- 15 Figure 7 : Carte de restriction du fragment HindIII contenu dans le plasmide pCO1.
- Figure 8 : Représentation des plasmides d'expression pPY40 et pPY6
- 20 Figure 9 : Représentation du plasmide pGY10
- Figure 10 : Représentation du plasmide pCO1-(ORF6+ORF7)
- Figure 11 : Représentation des plasmides pPY78 et pPY77
- Figure 12 : Représentation des plasmides pPY15 et pJY1
- Figure 13 : Représentation d'un type de virus selon l'invention
- 25 Figure 14 : Représentation des plasmides pXL2675 et pXL2757
- Figure 15 : Représentation des cartes de restriction des plasmides pPY66, pPY82 et pPY75
- Figures 16 : (A) Représentation schématique d'une recombinaison homologue entre le réplicon HincP/Ad5 et le plasmide pPY66 et (B).
- 30 Figure 17 : Protocole pour générer le génome viral HincP/Ad5[delE4(Y+ITR)] via recombinaison homologue des deux réplicons pPY82 et HincP/ Ad5[delE4-(SacB+SpecR)].
- Figure 18 : Représentation de HincP/Ad5[ITRYdelE1(SacB+SpecR)delE4(Y+ITR)] et HincP/Ad5[ITRYdelE1(ORF6 +ORF7)delE4(Y+ITR)]
- 35 Figure 19 : Cartes de restriction des plasmides pPY70, pPY71 et pPY72

Figure 20: Cartes de restriction des plasmides pGY12, pGY14 et pMC2

Figure 21: Cartes de restriction des plasmides pPY91, pPY94 et pPY92

Figure 22: Protocole de préparation de virus défectifs selon l'invention.

Techniques générales de biologie moléculaire

5 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondament décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

10 15 Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories). Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) 20 selon les recommandations du fournisseur. Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des 25 extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

30 35 La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham. L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5457] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemple 1 - Construction du plasmide pCO1 (figure 7)

A - Construction du plasmide pCE

Le fragment EcoRI-XbaI correspondant à l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a d'abord été cloné entre les sites EcoRI et XbaI du vecteur pIC19H. Ceci génère le plasmide pCA. Le plasmide pCA a ensuite été coupé par Hinfl, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par EcoRI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCA qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites EcoRI et SmaI du vecteur pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481). Ceci génère le plasmide pCB. Le plasmide pCB a ensuite été coupé par EcoRI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par BamHI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCB qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites NruI et BglII du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCE dont une caractéristique intéressante est qu'il possède les 382 premières paires de bases de l'adénovirus Ad5 suivies d'un multisite de clonage.

B - Construction du plasmide pCD'

Le fragment Sau3A (3346) - SstI (3645) et le fragment SstI (3645) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 ont tout d'abord été ligaturés et clonés entre les sites Clal et BamHI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY53. Le fragment SalI-Taql du plasmide pPY53 préparé à partir d'un contexte dam-, contenant la partie du génome de l'adénovirus Ad5 comprise entre les sites Sau3A (3346) et Taql (5207) a ensuite été cloné entre les sites SalI et Clal du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pCA'. Le fragment Taql (5207) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment SalI-Taql du plasmide pCA' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites SalI et NarI du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCC'. Le fragment NarI (5519) - NruI (6316) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment SalI-NarI du plasmide pCC' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites SalI et NruI du vecteur pIC20R. Ceci génère le plasmide pCD'.

C - Construction du plasmide pC01

Une digestion partielle par Xhol puis une digestion complète par SalI du plasmide pCD' génère un fragment de restriction qui contient la séquence de

l'adénovirus Ad5, du site Sau3A (3446) au site NruI (6316). Ce fragment a été cloné dans le site SalI du plasmide pCE. Ceci génère le plasmide pCO1 (figure 7), qui contient la partie gauche de l'adénovirus Ad5 jusqu'au site Hinfl (382), un multisite de clonage et le fragment Sau3A (3446) - NruI (6316) de l'adénovirus Ad5.

5 **Exemple 2 - Construction des plasmides de type pCO1-E4 (figure 7)**

Cet exemple décrit la construction de plasmides de type pCO1-E4, c'est-à-dire de plasmides obtenus par incorporation de tout ou une partie fonctionnelle de la région E4 d'un adénovirus dans le plasmide pCO1 (exemple 1).

10 **2.1. Clonage de la région E4 dans son intégralité**

2.1.1. Exprimée à partir du promoteur originel de la région E4

- Le plasmide pPY2 correspond au clonage du fragment Avr2-SalI (environ 1.3 kb incluant le promoteur/LTR du virus MMTV) du plasmide pMSG (Pharmacia) entre les sites XbaI et SalI du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte *E. coli* dam⁺.
- 15 - Le plasmide pPY4 dérive du plasmide pPY2 par délétion d'un fragment de 35 pb après coupure par BamH1 et Bgl2 puis religature.
- Le plasmide pPY5 correspond au clonage du fragment TaqI-Bgl2 (position 35576-32490) incluant la région E4 de l'Ad5 entre les sites ClaI et BamH1 du plasmide pIC20H. Dans ce plasmide, la totalité de la région E4 de l'Ad5 est donc maintenant bordée par des sites EcoRV et SphI provenant du multisite de clonage. La digestion partielle du plasmide pPY5 par EcoRV puis une digestion par SphI permet de purifier un fragment EcoRV-SphI d'environ 3.1 kb incluant la totalité de la région E4 de l'Ad5.
- 20 - Le clonage de ce fragment EcoRV-SphI entre les site SmaI et SphI du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY6 (Figure 8).
- Le plasmide pPY6* est identique au plasmide pPY6 à l'exception du site XbaI qui a été détruit après coupure par remplissage à l'aide du fragment Klenow de la DNA polymérase d'*E. coli* (Biolabs), puis religature. Le plasmide pPY6* contient donc la totalité de la région E4 (du site TaqI en position 35576 et jusqu'à la position 32490 localisée approximativement 300 pb après le site de polyadénylation) exprimée sous contrôle du promoteur LTR du virus RSV.

Le plasmide pFG144 [F.L. Graham et al. EMBO J. (1989) 8 2077-2085] contient notamment un fragment Sau3A de 1162 pb incluant l'extrémité droite du

génome de l'Ad5 à partir de la position 34773. Ce fragment est alors cloné dans le site BamHI du plasmide pIC20H ce qui génère le plasmide pGY9 dans lequel le fragment Sau3A est maintenant inclus dans un fragment BamHI-EcoRI de 1184 pb du fait de l'orientation du fragment relativement au vecteur. Ce fragment est alors purifié par 5 electroélution, coupé par AvrII, puis soumis à une hydrolyse partielle par l'enzyme MaeII. Un des produits de restriction corresponds au fragment MaeII (35835)-AvrII (35463) qui inclusele promoteur de la région E4 de l'Ad5 et jusqu'à la limite de l'ITR droite. Ce fragment de 372 pb est alors purifié par électroélution et ligaturé en présence du fragment AvrII-Sall du plasmide pPY6* entre les sites Clal et Sall du 10 plasmide pCOI ce qui génère le plasmide pGY10 (Figure 9) qui est du type pCOI-E4 (Figure 7).

2.1.2. Exprimée à partir d'un promoteur hétérologue

15 i) Expression à partir du LTR du virus MMTV

Le plasmide pPY6 est la source d'un fragment Xhol-Sall d'environ 4.5 kb correspondant à la cassette d'expression LTR MMTV/E4. Le clonage de cette cassette au site Sall du plasmide pCO1 génère le plasmide pCO1-MMTV/E4 (2 orientations possibles de la région E4 vis à vis de l'ITR et de la séquence Ψ) qui est du 20 type pCO1-E4.

ii) Expression à partir du promoteur pGRES

Le clonage du fragment XbaI (environ 1 kb) du plasmide pGRES.1 inclus une cassette d'expression composée d'un promoteur minimal hautement inductible aux glucocorticoides et d'un signal de polyadénylation [Mader and White Proc. Natl. Acad. Sci. (1993) 90 5603-5607]. Le clonage de ce fragment entre les sites XbaI du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte dam- génère le plasmide pPY21 dans lequel les 5 sites de liaison pour le récepteur aux glucocorticoides sont maintenant localisés à proximité immédiate du site Bgl2 provenant du multisite de clonage. Le 25 plasmide pPY21 est la source d'un fragment Bgl2-EcoR1 d'environ 0.8 kb correspondant au promoteur minimal hautement inductible aux glucocorticoides. Le clonage de ce fragment entre les sites Bgl2 et EcoR1 du plasmide pIC20H génère le 30 plasmide pPY26.

Le plasmide pPY5 est la source d'un fragment EcoRV-Hind3 d'environ 0.65 kb 35 qui inclus le fragment Taq1-Hind3 des positions 35576 à 34930 sur le génome de

l'Ad5. Le clonage de ce fragment entre les sites EcoRV et Hind3 du plasmide pIC20R génère le plasmide pPY24 dans lequel un site EcoR1 est maintenant localisé à proximité du site Taq1 (position 35576). Le clonage des fragments EcoR1-Hind3 (0.65 kb) du plasmide pPY24 et du fragment Hind3-Sph1 (environ 2.4 kb incluant l'ADN de l'Ad5 entre les positions 34930 et 32490) du plasmide pPY5, entre les sites EcoR1 et Sph1 du plasmide pIC20H génère le plasmide pPY37. Ce plasmide est la source d'un fragment EcoR1-Sph1 d'environ 3.1 kb qui comporte la totalité de la région E4 de l'Ad5 des positions 35576 à 32490. Le ~~clonage~~ de ce fragment entre les sites EcoR1 et Sph1 du plasmide pPY26 génère le plasmide d'expression pPY40 (Figure 8) dans lequel la région E4 est exprimée à partir du promoteur pGRES. Dans ce plasmide le 1er site donneur d'épissage de la région E4 est conservé. La cassette d'expression pGRES/E4 du plasmide pPY40 est disponible sous la forme d'un fragment Bgl2-Sal1 d'environ 3.9 kb dont le clonage entre les sites BamH1 et Sal1 du plasmide pCO1 génère le plasmide pCO1-pGRES/E4 qui est du type pCO1-E4 (Figure 7).

15

2.2. Clonage d'une sous-région E4 fonctionnelle.

2.2.1. Exprimée à partir du promoteur original de la région E4

i) Séquence ORF6+ORF7 minimale

20 Le plasmide pGY47' correspondant au clonage du fragment Bgl2-Sal1 (qui inclus la région E4 de l'Ad5 des positions 34115 à 32490, soit la totalité des phases de lecture ORF6 et ORF7 de la région E4) du plasmide pPY6 entre les sites correspondants du plasmide pIC20R. Dans le plasmide pGY47', la région ORF6+ORF7 de la région E4 est maintenant incluse dans un fragment Cla1-Sal1 d'environ 1.65 kb.

25 Le fragment Mae2-Avr2 correspondant à la séquence de l'Ad5 des positions 35835 à 35464 est purifié par électroélution après hydrolyse partielle par Mae2 et hydrolyse totale par Avr2. Ce fragment est alors hydrolysé par Taq1 et le fragment Mae2-Taq1 (positions 35835 à 35576) est cloné en présence du fragment Cla1-Sal1 (1.65 kb) provenant du plasmide pGY47' entre les sites Cla1 et Sal1 du plasmide pCO1. Un des produits de la réaction correspond au plasmide pCO1-(ORF6+ORF7) (Figure 10) qui est du type pCO1-E4.

30 Dans une autre exemplification particulièrement intéressante, la séquence située entre le codon stop de ORF7 et le site Bgl2 (jusqu'à la position 32490 ce qui inclus le site de polyadénylation de E4) est déletée et remplacée par un site de polyadénylation hétérologue. Ainsi, le Fragment Xba1-Sal1 (environ 0.25 kb) correspondant au signal

de polyadénylation "tardif" du virus SV40 est isolé à partir du plasmide pGL3 et cloné entre les sites correspondants du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte dam+, ce qui génère le plasmide pPY76. Le clonage des fragments Kpn1-BssH2 (positions 33598 à 33249 sur le génome de l'Ad5) et BssH2-Sau3A (positions 33249 à 5 32891) entre les sites Kpn1 et BamH1 du plasmide pPY76 génère le plasmide pPY77 (Figure 11). Ce plasmide est la source d'un fragment Kpn1-Sal1 (environ 0.7 kb incluant les séquences comprises entre les positions 33598 à 32891) dont le clonage entre les sites correspondants du plasmide pCO1-(ORF6+ORF7) génère le plasmide pPY78 (Figure 11) qui est du type pCO1-E4.

10

ii) Séquence ORF6 uniquement

Le clonage des fragments Kpn1-BssH2 (positions 33598 à 33249 sur le génome de l'Ad5) et BssH2-Pvu2 (positions 33249 à 33126) entre les sites Kpn1 et SmaI du plasmide pPY76 génère le plasmide pPY79. Ce plasmide est la source d'un fragment 15 Kpn1-Sal1 (environ 0.5 kb incluant les séquences comprises entre les positions 33598 à 33126) dont le clonage entre les sites correspondants du plasmide pCO1-(ORF6+ORF7) génère le plasmide pCO1-(ORF6) qui est du type pCO1-E4.

20

iii) Séquence ORF3 uniquement

Un plasmide du type pCO1-E4 dans lequel seule la phase de lecture ORF3 de la région E4 est présente peut également être construit de façon analogue. En effet, il est connu que la seule expression de ORF3 est suffisante pour compléter des virus déletés pour la région E4.

25

2.2.2. Exprimée à partir d'un promoteur hétérologue

i) Expression à partir du LTR du virus MMTV

Le fragment Bgl2-XbaI (environ 1.65 kb) du plasmide pPY6 inclus la séquence de l'Ad5 entre les positions 34115 et 32490 (ORF6+ORF7 de la région E4). Le clonage 30 de ce fragment entre les sites Bgl2 et XbaI du plasmide pIC20H génère le plasmide pPY13. Ce plasmide comporte maintenant la sous-région E4 (ORF6+ORF7) de l'Ad5 dans un fragment Xho1-Sph1 d'environ 1.65 kb. Le clonage de ce fragment entre les sites Sal1 et Sph1 du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY15 (Figure 12) qui comporte un fragment Xho1-Sal1 d'environ 3.1 kb et correspondant à une cassette 35 d'expression de (ORF6+ORF7) de la région E4 de l'Ad5 sous contrôle du promoteur

LTR du virus MMTV. Le clonage de ce fragment au site Sal1 du plasmide pCO1 génère le plasmide pCO1-MMTV/(ORF6+ORF7) qui est du type pCO1-E4.

ii) Expression à partir du promoteur pGRES

- 5 Le fragment Bgl2-Sal1 du plasmide pPY13 (environ 1.65 kb) inclus la sous-région E4 (ORF6+ORF7) de l'Ad5. Le clonage de ce fragment entre les sites BamH1 et Sal1 du plasmide pIC20H génère le plasmide pPY45 dans lequel la sous-région (ORF6+ORF7) est maintenant incluse dans un fragment-EcoR1-Sph1 d'environ 1.65 kb. Le clonage de ce fragment entre les sites EcoR1 et Sph1 du plasmide pPY26 génère le plasmide 10 pJY1 (Figure 12) qui inclus une cassette d'expression de la sous-région (ORF6+ORF7) exprimée à partir du promoteur pGRES sous la forme d'un fragment Bgl2-Sal1 d'environ 2.5 kb. Le clonage de ce fragment Bgl2-Sal1 entre les sites BamH1 et Sal1 du plasmide pCO1 génère le plasmide pCO1-pGRES/(ORF6+ORF7) qui est du type pCO1-E4 (Figure 7).

15

Exemple 3 - Construction des adénovirus recombinants dérivés des plasmides de type pCO1-E4

Cet exemple décrit la construction d'adénovirus recombinants portant une délétion dans la région E1 allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446, une région E4 inactivée, et tout ou une partie fonctionnelle de E4 insérée dans la délétion E1.

Les techniques de l'homme de l'art permettent de construire et de propager des adénovirus recombinants E1-E4⁺ dans la lignée 293. Les plasmides du type pCO1-E4 peuvent être par exemple cotransférés dans les cellules 293 en présence d'un génome viral portant une modification/déletion dans la région E4 de sorte que cette région soit non fonctionnelle (mutation dans ORF3 et ORF6 au moins). De tels virus sont donc non viables dans une lignée qui ne transcomplémente pas fonctionnellement la région E4. Par contre ces virus peuvent être préalablement propagés dans la lignée W162 [Weinberg and Ketner Proc. Natl. Acad. Sci. (1983) 80: 5383-5386], ou dans une des lignées 293E4⁺ décrites dans le brevet FR. 94 04590 (18.04.1994). De tels virus incluent les virus Ad2dl808 [Challberg and Ketner Virology (1981) 114: 196-209], Ad5dl1004, Ad5dl1007, ou Ad5dl1014 [Bridge and Ketner J. Virol. (1989) 63: 631-638], ou encore Ad5dl1011 [Bridge et al. Virology (1993) 193: 794-801] etc... Ainsi la cotransfection des plasmides de type pCO1-E4 linéarisés par l'enzyme XmnI et

l'ADN génomique viral des virus portant une région E4 non fonctionnelle et restreint par l'enzyme Clal génère les virus correspondants après recombinaison homologue entre les deux ADN dans la lignée 293. Ces virus se caractérisent donc par la présence de l'ITR gauche et d'une séquence d'encapsidation fonctionnelle (séquence Ψ , nucléotide 1-382 par exemple), suivie d'une région E4 fonctionnelle (entièr⁵e ou au moins ORF3 ou ORF6) exprimée à partir d'un promoteur fonctionnel et par exemple le promoteur originel de la région E4 [inclus dans le fragment TaqI(35576)-MaeII(35835)], ou un promoteur inductible, suivie de la région située en aval du site Sau3A localisé à la position 3446 du génome de l'Ad5, et se poursuivant jusqu'à l'ITR droite et donc incluant la délétion de la fonction E4 présente dans le virus E4⁻ de départ (Figure 13). Par exemple, des virus E1-E4⁺ caractérisés par une délétion E4 à droite du génome provenant du virus Ad5dl1011 peuvent être propagés dans la lignée 10 293 à des titres supérieurs à 10¹¹ PFU/ml.

15 Exemple 4 . Introduction de la séquence Ψ à droite du génome viral

4.1. Introduction d'une cassette (SacB+specR) dans la région E4

4.1.1 Construction du plasmide pPY66

Le fragment Bcl1-Avr2 (environ 0.5 kb) provenant du plasmide pFG144 correspond à l'extrémité droite du génome de l'Ad5 à partir du site Avr2 en position 35464. Le 20 clonage de ce fragment entre les sites XbaI et BamH1 du plasmide pIC19H préparé à partir d'un contexte *E. coli* dam- génère le plasmide pPY23. Ce plasmide est la source d'un fragment Sal1-Hae3 d'environ 320 pb incluant l'extrémité droite du génome de l'Ad5 jusqu'au site Hae3 à la position 35617. Le clonage de ce fragment entre les sites 25 XhoI et EcoRV du plasmide pIC20H génère le plasmide pPY29.

Le fragment Bgl2-SmaI correspondant au génome de l'Ad5 entre les positions 32490 et 33093 est alors cloné entre les sites BamH1 et SmaI du plasmide pPY29 ce qui génère le plasmide pPY64. Ce plasmide est la source d'un fragment Xba1-Hind3 dont le clonage entre les sites correspondants du multi-site de clonage du plasmide pXL2675 (Figure 14) génère le plasmide pPY65. Le plasmide pXL2675 (2513 pb) est un réplicon de type ColE1 (inclus dans le fragment BsA1- Pvu2 d'environ 1.15 kb et provenant du plasmide commercial pBKS+) possédant un gène conférant la résistance à la kanamycine (provenant de Tn5, plasmide Pharmacia pUCKXXX) chez *E. coli* et un multisite de clonage synthétique.

Le plasmide pXL2757 (Figure 14) est la source d'un fragment SmaI-EcoRV d'environ 4 kb contenant le gène *sacB* de *B. subtilis* et un gène conférant la résistance à la spectinomycine chez *E. coli*. La cassette (*SacB+SpecR*) de ce fragment clonée dans le site SmaI du plasmide pPY65 génère le plasmide pPY66 (Figure 15).

5

4.1.2 Construction du génome viral chez *E. coli*

Le plasmide pPY66 est utilisable pour introduire la cassette (*SacB+SpecR*) par recombinaison homologue avec un génome viral dérivé de l'Ad5 et inclus dans un réplicon fonctionnel chez *E. coli* *polA*. La technologie, décrite dans la demande de Brevet FR 95 016323, repose sur l'utilisation de certaines propriétés de la réplication chez *E. coli*. En effet, les réplicons de la classe d'incompatibilité HincP (et par exemple RK2) se répliquent en l'absence de l'enzyme codée par le gène *polA*. A l'inverse, les réplicons de type ColE1 (plasmides de type pUC, pIC, pBR ...) ont besoin de cette enzyme pour se répliquer. Sur la base de cette observation, le génome de l'Ad5 dérivé du plasmide pFG144 à d'abord été cloné sur le plasmide RK2 (de la classe HincP) puis introduit par électroporation dans une souche d'*E. coli* mutée dans le gène *polA*. Le fragment *Xba*1 qui comporte le réplicon ColE1 (pBR) inclus à la place de la région E3 dans le plasmide pFG144 a alors été déleté du génome (demande de Brevet FR 95 016323). Ceci génère la souche d'*E. coli* appelée *E. coli* *polA/Ad5*. Un point important est que le génome adénoviral présent dans cette souche est bordé de sites *Pac*I de part et d'autre des ITR et que de tels génomes sont infectueux après transfection dans les cellules 293.

L'introduction de la cassette (*SacB+SpecR*) par recombinaison homologue chez *E. coli* *polA/Ad5* s'effectue de la façon suivante:

25 a) Le plasmide pPY66 est d'abord introduit par électroporation chez *E. coli* *polA/Ad5*. Une sélection en présence de spectinomycine et de kanamycine est effectuée. Les clones résistants correspondent alors à la formation d'un cointégrat entre le réplicon HincP/Ad5 et le plasmide pPY66. Dans la quasi-totalité des cas, il y a eu insertion du plasmide pPY66 par un événement de recombinaison homologue entre les deux types de réplicons. Un clone correspondant au résultat d'une recombinaison au niveau de la région E4 entre les positions 32490 à 33093 (603 pb) est alors isolé (Figure 16A).

30 b) Ce clone bactérien possède une "répétition en sens direct" des séquences (A et B) de part et d'autre de la cassette (*SacB+SpecR*): 603 pb d'une part et 320 pb (extrémité droite du génome) d'autre part. La présence de telles séquences est une

source d'instabilité et donne lieu à de rares évènements de recombinaison homologue de part et d'autre de la cassette (SacB+SpecR). Ces évènements de recombinaison homologues aboutissent à l'éjection du réplicon colE1 et donc à la perte du marqueur de résistance à la kanamycine. Les évènement de recombinaison les plus nombreux ont lieu au niveau de la séquence de 603 pb et ne sont pas intéressant car ils régénèrent la situation de départ, c-a-d. un génome adénoviral ayant une région E4 non modifiée et ayant perdus leur caractère de résistance à la spectinomycine car ils ne possèdent plus la cassette (SacB+SpecR). Ils sont donc sensibles à cet antibiotique et sont de plus capables de pousser en présence de sucre comme source de carbone. A l'inverse, un évènement de recombinaison homologue au niveau des 320 pb à l'extrémité droite du génome (séquence B) aboutit à la perte de la région E4 initialement présente, et à son remplacement par la cassette (SacB+SpecR) (Figure 16A). Ceci génère des clones d'*E. coli* appelé *E. coli* polA/Ad5[delE4(SacB+SpecR)]. De tels clones sont résistants à la spectinomycine et sont incapables de pousser en présence de sucre comme unique source de carbone. Un clone d'*E. coli* possédant un tel génome modifié à l'extrémité droite est isolé du fait de son phénotype "kanamycine sensible", spectinomycine résistant, et sensibilité au sucre.

4.2. Introduction de la séquence Ψ à droite du génome viral

4.2.1 Construction du plasmide pPY82

Le fragment Sall-Smal provenant du plasmide pPY6* et correspondant au génome de l'Ad5 des positions 32490 à 33093 est d'abord cloné entre les sites correspondants du plasmide pCO7 ce qui génère le plasmide pPY81. Le plasmide pCO7, obtenu après restriction totale du plasmide pCO1 par Pst1 et religature, contient donc l'extrémité gauche de l'Ad5 jusqu'à la position 382, le multi-site de clonage du plasmide pCO1, suivi de la séquence de l'Ad5 des positions 3446 jusqu'au site Pst1 localisé à la position 3788. Le plasmide pPY81 est la source d'un fragment H3-Xba1 d'environ 1.4 kb dont le clonage entre les sites correspondants du plasmide pXL2675 génère le plasmide pPY82 dont une carte de restriction est donnée à la Figure 15.

4.2.2 Construction du génome viral chez *E. coli*

L'introduction de la séquence Ψ à proximité immédiate de l'ITR droite se fait également par recombinaison homologue après introduction du plasmide pPY82 par électroporation chez *E. coli* génère le génome viral HincP/Ad5[delE4(Ψ +ITR)]. L'évènement de fusion des réplicons est d'abord sélectionnée en présence de kanamycine. Un clone correspondant à un évènement de recombinaison homologue

entre les séquences 32490 et 33093 communes aux deux réplicons est alors isolé (Figure 16B). L'évènement d'éjection du réplicon ColE1 (provenant du plasmide pXL2675) est alors amplifié en levant la sélection à la kanamycine pendant un nombre suffisant de générations. Le glucose comme source de carbone est alors remplacé par du sucre et on isole ainsi les clones bactériens pour lesquels l'évènement d'éjection du réplicon ColE1 s'est effectué par recombinaison homologue au niveau de l'ITR ce qui génère le génome viral HincP/Ad5[delE4(Ψ +ITR)] (Figure 16B). Un clone correspondant à cet évènement est alors isolé: E. coli polA/Ad5[delE4(Ψ +ITR)].

10 **Exemple 5 - Mise au point d'une construction utile pour obtenir un virus dont le génome présente une délétion de la séquence Ψ à gauche**

5.1. **Introduction d'une cassette (SacB+SpecR) à gauche du génome viral**

15 Le fragment Hind3-EcoRV (environ 0.4 kb) du plasmide pCO1 inclus l'extrémité gauche du génome viral jusqu'à la position 382. Le clonage de ce fragment entre les sites correspondants du plasmide pXL2675 génère le plasmide pPY83. Le plasmide pCO1DSal est obtenu après digestion du plasmide pCO1 (préparé dans un contexte dam+) par l'enzyme XbaI, traitement par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I
20 d'E. coli, puis religature. Ce plasmide est la source d'un fragment BamH1-NsiI d'environ 1 kb qui inclus les séquences de l'Ad5 des positions 3446 à 4419 (site NsiI). Le clonage de ce fragment entre les sites BamH1 et PstI du plasmide pIC20R génère le plasmide pPY86 dans lequel les séquences comprises entre les positions 3446 à 4419 sont maintenant incluses dans un fragment BamH1-Bgl2. Le clonage de ce
25 fragment au site BamH1 du plasmide pPY83 génère le plasmide pPY87. Le fragment SmaI-EcoRV correspondant à la cassette (SacB+SpecR) du plasmide pXL2757 est alors cloné dans le site EcoRV du plasmide pPY87, ce qui génère le plasmide pPY88 (Figure 17). Ce plasmide est utilisé pour remplacer, selon une procédure analogue à la procédure décrite à la Figure 16A, la partie gauche du génome HincP/Ad5[delE4(Ψ +ITR)] par la partie correspondante provenant du plasmide pPY88, ce qui génère le génome viral noté HincP/Ad5[ITR Ψ delE1(SacB+SpecR)delE4(Ψ +ITR)] dont la structure est donnée à
30 la Figure 18.

5.2. Déletion de la séquence Ψ et introduction d'une région E4 fonctionnelle.

5.2.1. Construction du plasmide pGY50'

5 L'extrémité droite du génome de l'adénovirus a été amplifiée par PCR avec les
oligonucléotides 5'-
CGGCGGGAATTCTTAATTAACATCATCAATAATAACCTTATTTGG-3'
(SEQ ID N°2) (les sites EcoR1 et Pac1 sont soulignés) et 5'-
CACCACCTGCAGGGCAGCCATAACAGTCAGCCTTACC-3'(SEQ ID N°3) (le site Pst1 est souligné) en utilisant le plasmide pY23 comme substrat (ce plasmide
10 contient l'extrémité droite du génome adénoviral jusqu'au site Avr2 localisé à la
position 35464). L'amplification PCR génère donc un fragment de 418 pb
correspondant à l'extrémité droite de l'Ad5 et dans lequel un site Pac1 puis un site
EcoR1 ont été introduits immédiatement en amont de l'ITR, alors qu'un site Pst1 se
15 trouve localisé à proximité immédiate de la position 35517. Le clonage de ce fragment
entre les sites EcoR1 et Pst1 du plasmide pUC19 génère le plasmide pXL2624 (Cf.
demande de Brevet FR.95 016323).

Le fragment EcoR1-Taq1 du plasmide pXL2624 correspondant à l'extrémité
droite du génome viral à partir du site Taq1 en position 35576 est cloné entre les sites
20 EcoR1 et Cla1 du plasmide pGY47', ce qui génère le plasmide pPY89. Ce plasmide
est la source d'un fragment EcoR1-Sal1 d'environ 2 kb incluant l'extrémité droite du
génome viral jusqu'à la position 35576, puis la sous région E4 (ORF6+ORF7) des
positions 34115 à 32490. Le clonage des fragments EcoR1-Sal1 du plasmide pPY89
25 et Sal1-Nsi1 (incluant le génome de l'Ad5 des positions 3446 à 4419) du plasmide
pCO1 entre les sites EcoR1 et Pst1 du plasmide pXL2675 génère le plasmide pGY50'
(Figure 17).

5.2.2. Construction du plasmide pPY90'

Le fragment Kpn1-Sst1 (environ 0.95 kb) du plasmide pPY78 correspond à la partie
30 C-terminale de la région E4 comprise entre les positions 32891 à 33598,
immédiatement suivie du signal de polyadénylation "tardif" du virus SV40. Le clonage
de ce fragment entre les sites correspondants du plasmide pPY89 génère le plasmide
pPY90. Ce plasmide est la source d'un fragment EcoR1-Sal1 d'environ 2 kb incluant
l'extrémité droite du génome viral jusqu'à la position 35576, puis la sous région E4
35 (ORF6+ORF7) des positions 34115 à 32891. Le clonage des fragments EcoR1-Sal1

du plasmide pPY90 et SalI-NsiI (incluant le génome de l'Ad5 des positions 3446 à 4419) du plasmide pCO1 entre les sites EcoR1 et PstI du plasmide pXL2675 génère le plasmide pGY90' (Figure 17).

5 5.2.3. Introduction d'une région E4 fonctionnelle à l'extrémité gauche

Les plasmide pGY50' ou pPY90' sont utilisés pour remplacer, selon une procédure analogue à la procédure décrite à la Figure 16B, la partie gauche du génome HincP/Ad5[ITR Ψ delE1(SacB+SpecR)[delE4(Ψ +ITR)] par la partie correspondante provenant desdits plasmides. Par exemple, l'utilisation du plasmide pPY90' génère le génome viral noté HincP/Ad5[ITRD Ψ delE1(ORF6+ORF7)[delE4(Ψ +ITR)] dont la structure est donnée à la Figure 18.

Exemple 6 - Mise au point d'une construction utile pour obtenir un virus dont le génome présente de nouvelles délétions E4 à droite

15 6.1. En l'absence de la séquence Ψ

6.1.1. Délétion Mae2-Hae3 (32811-35617)

Le plasmide pPY32 est décrit dans la demande de brevet Fr. 94 04590 (18.04.94). Ce plasmide est la source d'un fragment Bgl2-Hind3 d'environ 0.65 kb correspondant à l'extrémité droite du génome de l'Ad5 à partir du site Bgl2 (position 32490) et déleté entre les sites Mae2 (position 32811) jusqu'au site Hae3 (position 35617). Le clonage de ce fragment entre les sites BamH1 et Hind3 du plasmide pXL2675 génère le plasmide pPY70, dont une carte de restriction est donnée à la Figure 19. Ce plasmide est utilisable pour introduire la délétion E4 correspondante par recombinaison homologue, par exemple chez E. coli polA/Ad5[delE4(SacB+SpecR)].

6.1.2. Délétion Taq1-Avr2 (33055-35464)

Le plasmide pGY12 corresponds au clonage du fragment BssH2-Msc1 (positions 33249-32720) entre les sites BssH2 et EcoRV du plasmide commercial pSL1180 (Figure 20). Le clonage des fragments EcoR1-Taq1 du plasmide pXL2624 (ce fragment corresponds à l'extrémité droite du génome de l'Ad5 jusqu'au site Taq1 en position 35576) et Taq1-BssH2 (positions 35576 à 33249) entre les sites EcoR1 et BssH2 du plasmide pGY12 génère le plasmide pGY13. Ce plasmide est donc la

source d'un fragment EcoR1-Hpa1 (environ 3.25 kb) incluant l'extrémité droite du génome de l'Ad5 jusqu'à la position 32720. Le clonage de ce fragment entre les sites EcoR1 et Sma1 du plasmide pIC20H génère le plasmide pGY14 (Figure 20). Ce plasmide est la source d'un fragment EcoR1-BspH1 correspondant l'extrémité droite du génome de l'Ad5 jusqu'à la position 34700. Le clonage de ce fragment avec le fragment BspH1-Xba1 du génome de l'Ad5 (positions 33750 à 30470) entre les sites Xba1 et EcoR1 du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte dam+ génère le plasmide pMC2 (Figure 20).

Le fragment Sph1-Taq1 localisé entre les positions 31224 à 33055 sur le génome de l'Ad5 est purifié à partir du plasmide pMC2 puis cloné entre les sites Sph1 et Cla1 du plasmide pIC20H, ce qui génère le plasmide pYJ5. Après transfert dans un contexte E. coli dam-, ce plasmide est la source d'un fragment Bgl2-Xba1 qui inclus la séquence du génome viral situé entre les positions 32490 à 33055. Ce fragment Bgl2-Xba1 est alors cloné avec le fragment Avr2-Xho1 provenant du plasmide pMC2 et incluant l'extrémité droite du génome viral à partir du site Avr2 localisé à la position 35464, entre les sites BamH1 et Xho1 du plasmide pXL2675, ce qui génère le plasmide pPY71, (Figure 19). Ce plasmide est utilisable pour introduire la délétion E4 correspondante par recombinaison homologue, par exemple chez E. coli polA/Ad5[delE4(SacB+SpecR)].

20

6.1.3. Déletion Sma1-Sma1 (33093-35356)

Le plasmide pMC2DSma1 est obtenu après digestion totale du plasmide pMC2 par Sma1 puis religature. Ce plasmide est la source d'un fragment Bgl2-Hind3 d'environ 1.2 kb incluant la totalité de l'extrémité droite du génome de l'Ad5 à partir de la position 32490 et déléte dans la région E4 entre les positions 33093 et 35356. Le clonage de ce fragment entre les sites BamH1 et Hind3 du plasmide pXL2675 génère le plasmide pPY72 dont une carte de restriction est donnée à la Figure 19. Ce plasmide est utilisable pour introduire la délétion E4 correspondante par recombinaison homologue, par exemple chez E. coli polA/Ad5[delE4(SacB+SpecR)].

6.2. En présence de la séquence Ψ

6.2.1. Déletion Sma1-Sma1 (33093-35356)

Le fragment BamH1-EcoR1 du plasmide pGY9 (environ 1.2 kb) inclus l'extrémité droite du génome de l'Ad5 à partir du site Sau3A en position 34773. Ce fragment de restriction est purifié par électroélution, coupé par SmaI, puis soumis à une hydrolyse partielle par l'enzyme Mae2. Un des produits de restriction correspond au fragment 5 MaeII (35835)-SmaI (35356). Le clonage de ce fragment entre les sites SmaI et ClaI du plasmide pPY82 génère le plasmide pPY75 (Figure 15). Ce plasmide est utilisable pour introduire la délétion E4 correspondante par recombinaison homologue, par exemple chez *E. coli* polA/Ad5[delE4(SacB+specR)(Ψ +ITR)].

10 6.2.2. Délétion TaqI-SmaI (33055-35356)

Le fragment TaqI du plasmide pPY82 qui inclus les positions 32490 (site SalI du multisite de clonage) à 33055 est cloné dans le site ClaI du plasmide pIC20H ce qui génère le plasmide pICTaq dans lequel le site XhoI du multisite est positionné à proximité immédiate de la position 32490. Le plasmide pICTaq est la source d'un 15 fragment XhoI-SmaI incluant les positions 32490 à 33055 dont le clonage entre les sites SalI et SmaI du plasmide pPY75 génère le plasmide pPY91 (Figure 21).

6.2.3. Délétion Hpa2-SmaI (32980-35356)

20 Le fragment SalI-Hpa2 du plasmide pPY82 qui inclus les positions 32490 à 32980 est cloné entre les sites SalI et ClaI du plasmide pIC20H ce qui génère le plasmide pPY93. Ce plasmide est la source d'un fragment SalI-EcoRV incluant les positions 32490 à 32980 dont le clonage entre les sites SalI et SmaI du plasmide pPY75 génère 25 le plasmide pPY94 (Figure 21).

25 6.2.1. Délétion Sau3A-SmaI (32891-35356)

Le fragment Sau3A du plasmide pPY82 qui inclus les positions 32490 à 32891 est 30 cloné dans le site BamH1 du plasmide pIC20H ce qui génère le plasmide pICSau dans lequel le site SalI du multisite est positionné à proximité immédiate de la position 32490. Le plasmide pICSau est la source d'un fragment SalI-SmaI incluant les positions 32490 à 32891 dont le clonage entre les sites correspondants du plasmide pPY75 génère le plasmide pPY92 (Figure 21).

Exemple 7 - Protocole de transfection des cellules 293 par les génomes recombinants construits chez *E. Coli* selon les exemples 4 et 5.

La construction des plasmides décrits selon les exemples 4 et 5, ou de plasmides analogues qui par exemple sont caractérisés par des délétions E4 différentes, ou par des régions E4 fonctionnelles modifiées, ou par exemple correspondant à l'introduction 5 d'une cassette d'expression d'un gène thérapeutique donné ect..., sont utilisés pour générer les génomes viraux recombinants par recombinaison homologue chez *E. coli* polA. Après vérification par restriction, un clone bactérien est alors isolé et son contenu plasmidique est extrait et purifié. L'ADN est alors soumis à une digestion totale par l'enzyme *PacI* et transfected dans les cellules 293. Cet ADN est infectueux 10 (virus E1-E4+) et un effet cytopathique (CPE) apparaît après environ 2 semaines. Le CPE est alors progressivement amplifié dans les cellules 293 et un stock viral est préparé (cf. Demande de Brevet FR 016323).

Exemple 8 - Construction pour préparer un virus dont le génome présente un déplacement de la région pIX

8. 1. Construction du plasmide pCO1-pIX

Il est utile de modifier l'orientation des séquences codant pour la pIX virale au sein du génome, de telle sorte qu'une recombinaison entre le génome cellulaire et les ADN 20 viraux ne génère pas une particule réplicative, mais un virus ne contenant que ses ITR, les régions E1A et E1B et la séquence codant pour la pIX. Un tel virus est défectif et beaucoup plus petit que l'Adénovirus recombinant, ce qui permet facilement de le séparer par centrifugation sur chlorure de césium lors de la préparation des stocks viraux (Figure 22).

25 Le plasmide pCR2-pIX a été construit par clonage dans le plasmide PCR2 (Invitrogen) du produit d'amplification par PCR du plasmide pCO1 avec les oligonucléotides 5'-GATATCTGAAGATACAGATTGAG-3'(SEQ ID N°4) et 5'-CGGCCGTTAACCGCATTGGGAG-3'(SEQ ID N°5).

Le plasmide pIC-pIX-pA a été construit par clonage du fragment EcoRV-Eag1 30 de pCR2-pIX et du fragment Eag1-BamH1 du plasmide pCI (Promega) contenant le polyA de SV40 dans le plasmide pIC20R digéré par EcoRV et BamH1.

Le plasmide pCR2-IVa2 a été construit par clonage dans le plasmide PCR2 (Invitrogen) du produit d'amplification par PCR du plasmide pCO1 avec les

oligonucléotides 5'-AAGCTTATTGCCATCATTATGGAC-3'(SEQ ID N°6) et 5'-ACTAGTTATTTAGGGGTTTGCGC-3'(SEQ ID N°7).

Le plasmide pIC-IVa2-pA a été construit par clonage du fragment Hind3-SpeI de pCR2-IVa2 et du fragment Xba1-Sph1 du plasmide pCDNA3 (Invitrogen) 5 contenant le signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine, dans le plasmide pIC20R digéré par Hind3 et Sph1. Le fragment BstX1-SalI du plasmide pCO1, créé ainsi le plasmide pCO1-pIX. Le plasmide pCO1-pIX a été construit par introduction de la cassette Cla1 de pIC-pIX-pA dans le site Cla1 de pCO1-pIX, 10 de telle sorte que le gène codant pour la pIX soit orienté dans le même sens que celui codant pour la IVa2, contrairement à son orientation dans le génome adénoviral.

Le plasmide pCO1-pIX contient donc les séquences ITR-Ψ de l'Ad5, une cassette d'expression de la pIX du virus (promoteur et gène de la pIX suivis du polyA de SV40) orientée dans le sens inverse de son orientation naturelle au sein de l'Ad5, 15 suivis des séquences de la IVa2 dont le polyA a été remplacé par celui de l'hormone de croissance bovine.

8.2. Construction du virus

Le virus recombinant a été construit "de façon classique" par cotransfection dans les cellules 293 du plasmide pCO1-pIX linéarisé par Xho1 et par l'ADN viral du virus 20 AdRSVβGal digéré par Cla1.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron
(C) VILLE: ANTONY
10 (E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
(G) TELEPHONE: 40.91.69.22
(H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96

15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: ADENOVIRUS DEPOURVUS DE PARTICULES
CONTAMINANTES VIABLES, PREPARATION ET UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7

20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 30 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

40 AGATCCTCTA GCTAGAGTCG AC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 45 (A) LONGUEUR: 57 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CGGCAGGAAT TCTTAATTAA CATCATCAAT AATATACCTT ATTTTGG

57

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: paires de bases
 (B) TYPE: 37 nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 CACCACCTGC AGGGCAGCCA TAACAGTCAG CCTTACC

37

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GATATCTGAA GATACAGATT GAG

23

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGGCCGTAA ACCGCATTGG GAG

23

45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

10 AAGCTTATTG CCATCATTAT GGAC

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

15 20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ACTAGTTATT TAGGGTTTT GCGC

24

25

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un génome
5 d'adénovirus dont la région E1 est inactivée, dont l'organisation génomique est modifiée et dont la recombinaison éventuelle avec le génome de la lignée de production conduit à la génération de particules virales non-viables.
2. Adénovirus recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'au
10 moins une région essentielle à sa réplication et/ou à sa propagation est présente dans une position génomique autre que sa position d'origine.
3. Adénovirus recombinant selon la revendication 2 caractérisé en ce que la
région essentielle se situe à proximité ou au niveau d'une autre région génomique non
15 fonctionnelle.
4. Adénovirus recombinant selon la revendication 3 caractérisé en ce que la
région génomique non fonctionnelle est une région inactivée par mutation et/ou
délétion d'une ou de plusieurs bases.
20
5. Adénovirus recombinant selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce que
la région non fonctionnelle est inactivée par délétion partielle ou totale.
6. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 2 à 5 caractérisé en
25 ce que la région non fonctionnelle est représentée par la région E1 inactivée et/ou la
région E3.
7. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en
ce que la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment Pvull-BgIII allant du
30 nucléotide 454 au nucléotide 3328 ou d'un fragment HinfII-Sau3A allant du nucléotide
382 au nucléotide 3446.
8. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 2 à 7 caractérisé en
ce que la région essentielle à la réplication et/ou la viabilité virale est choisie parmi tout

ou partie de la région E4 et/ou de la région pIX-IVa2, et/ou de la région pIX et/ou de la région L5.

9. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications précédentes
5 caractérisé en ce que son organisation génomique est telle que la région E4 est positionnée, en tout ou partie, au niveau ou à proximité du site de délétion de la région E1.

10. Adénovirus recombinant selon la revendication 9 caractérisé en ce que la
région E4 est représentée par le fragment Macl-MscI correspondant aux nucléotides
35835-32720.

11. Adénovirus recombinant selon la revendication 9 caractérisé en ce que la
région E4 est représentée par au moins la phase codante ORF3.

15 12. Adénovirus recombinant selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce
que la région E4 est représentée par au moins la phase codante ORF6.

20 13. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé
en ce que son organisation génomique est telle que l'ensemble de la région codant pour
les protéines pIX et IVa2 est positionnée au niveau de la région E3, éventuellement en
remplacement de séquences déletées.

25 14. Adénovirus recombinant selon la revendication 13 caractérisé en ce que la
région codant pour pIX-IVa2 est constituée d'un fragment BglII-NruI comprenant les
nucléotides 3328 à 6316 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

30 15. Adénovirus recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que la
lignée de production est la lignée 293.

16. Adénovirus recombinant caractérisé en ce que son génome possède des
régions E1 et E4 inactivées et en ce que tout ou une partie fonctionnelle de la région
E4 est présente au niveau ou à proximité de la région E1 inactivée.

17. Adénovirus recombinant caractérisé en ce que son organisation génomique est telle que l'ensemble de la région codant pour la protéine pIX et tout ou seulement une partie fonctionnelle de la région E4 sont déplacées de leur position d'origine.

5

18. Adénovirus selon la revendication 17 caractérisée en ce que les deux régions sont déplacées au niveau de la région E1 en remplacement de séquences délétées.

10 19. Adénovirus selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que le cadre de lecture correspondant au domaine codant pour la protéine pIX y est placé en lecture inversée.

15 20. Adénovirus selon les revendications 17, 18, et 19 caractérisé en ce que l'extrémité gauche, comportant l'ITR et la région d'encapsidation, et l'extrémité droite, comportant l'ITR, sont permutées.

20 21. Adénovirus recombinant caractérisé en ce que son génome possède une région E1 inactivée et en ce que l'extrémité gauche, comportant l'ITR et la région d'encapsidation, et l'extrémité droite, comportant l'ITR et tout ou une partie fonctionnelle de la région E4, sont permutées.

25 22. Adénovirus recombinant selon les revendications 20 ou 21 caractérisé en ce que l'extrémité gauche est contenue dans les 382 premiers nucléotides du génome de l'Ad5 et l'extrémité droite est contenue dans les 3215 derniers nucléotides du génome de l'Ad5.

30 23. Adénovirus recombinant caractérisé en ce que son génome possède des régions E1 et L5 inactivées et en ce que tout ou une partie fonctionnelle de la région L5 est présente au niveau ou à proximité de la région E1 inactivée.

24. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une région d'encapsidation.

25. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'acides nucléiques hétérologue.
26. Adénovirus recombinant selon la revendication 25 caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend un ou plusieurs gènes thérapeutiques.
27. Adénovirus recombinant selon la revendication 25 ou 26 caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est présente au niveau des régions E1, 10 E3 ou E4, en supplément ou en remplacement de séquences déletées.
28. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le génome d'adénovirus est d'origine humaine, animale, ou mixte.
29. Adénovirus selon la revendication 28 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence 15 parmi les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).
30. Adénovirus selon la revendication 28 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.
31. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 30.
- 20 32. Composition pharmaceutique selon la revendication 31 comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
33. Plasmides pCO1-E4 comprenant la partie gauche du génome de l'adénovirus Ad5, depuis l'ITR gauche jusqu'au nucléotide 6316, avec une délétion de 25 la région comprise entre les nucléotides 382-3446 correspondant au gène E1, au niveau de laquelle est inséré tout ou une partie fonctionnelle de E4.
34. Procédé de préparation d'adénovirus recombinants dépourvus de particules réplicatives caractérisé en ce que l'on co-transferte une lignée cellulaire compétente avec

- un premier ADN comprenant la partie gauche du génome dudit adénovirus, possédant une délétion dans la région E1 au niveau ou à proximité de laquelle est insérée au moins une partie fonctionnelle de la région E4, et

5 - un second ADN comprenant au moins la partie droite du génome dudit adénovirus, possédant une région E4 inactivée, et une partie commune à celle du premier ADN,

et on récupère les adénovirus produits par recombinaison.

35. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la lignée cellulaire
10 est la lignée 293.

36. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le premier ADN
est choisi parmi les plasmides de type pC01-E4.

15 37. Procédé selon l'une des revendications 34 à 36 caractérisé en ce que le
premier ou le second ADN porte en outre une séquence d'ADN hétérologue d'intérêt.

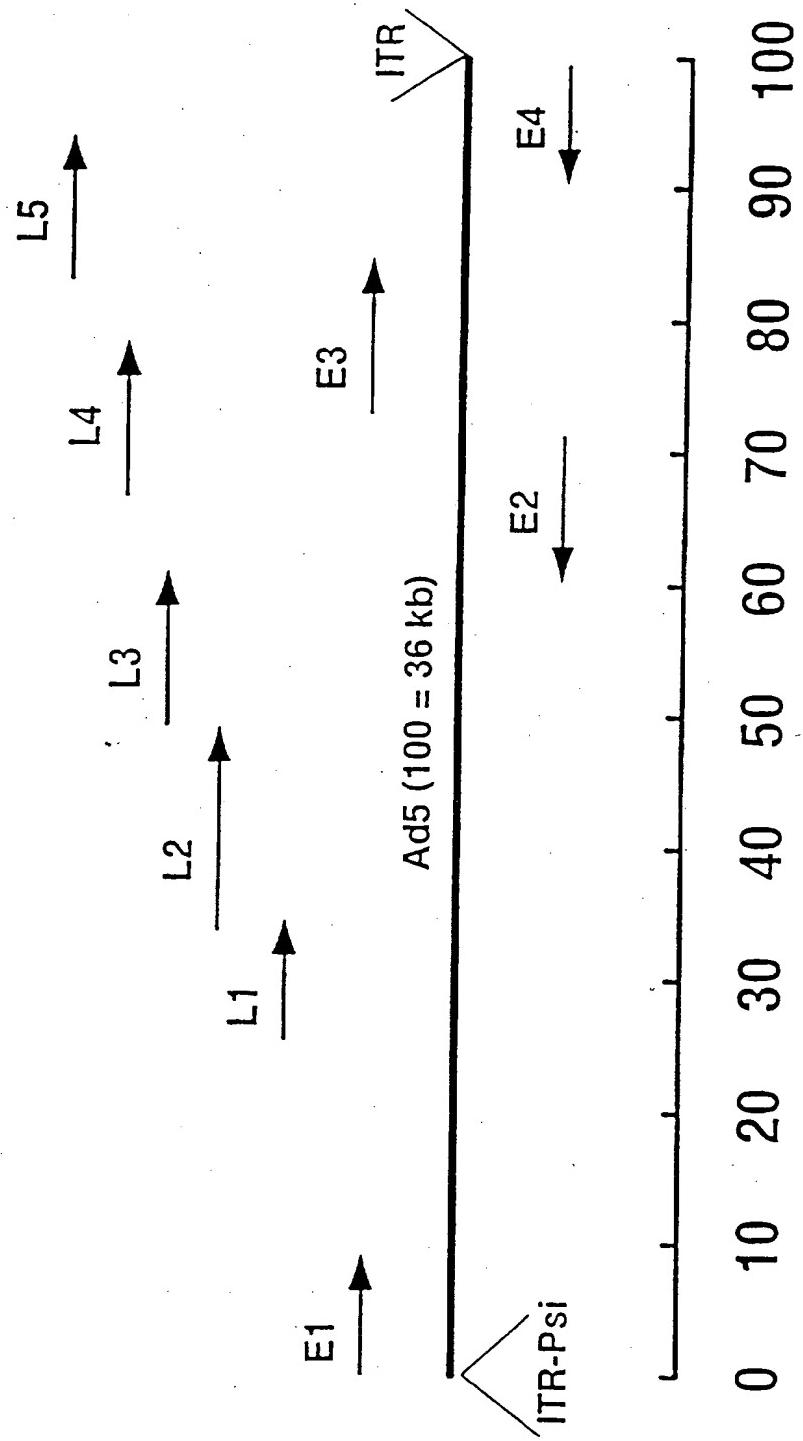


Figure 1

SINGLE RECOMBINATION AND CHROMOSOME BREAKAGE

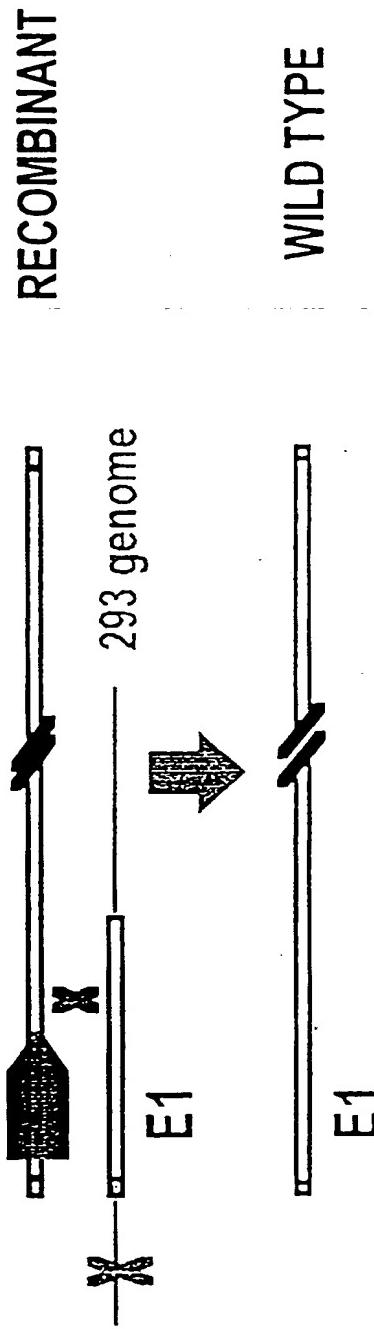


Fig. 2A

Figure 2

DOUBLE RECOMBINATION

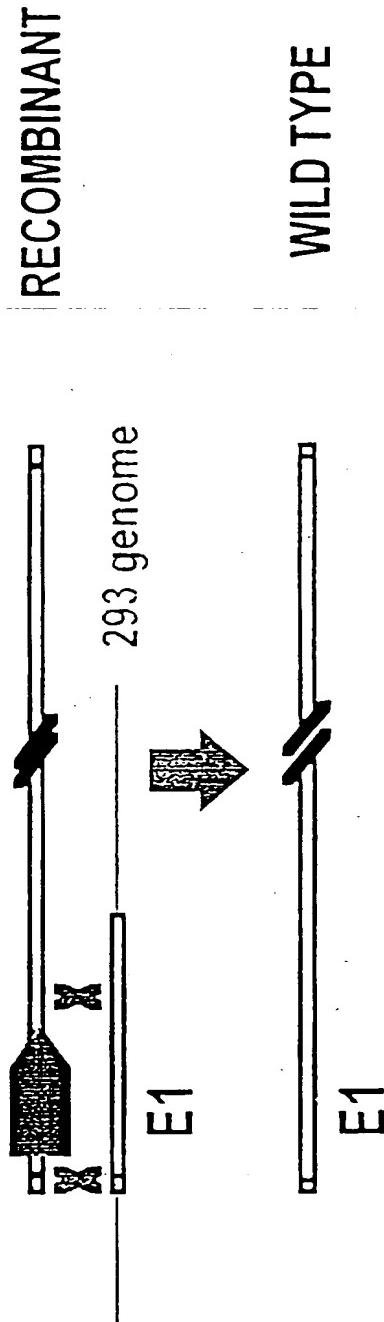


Fig. 2B

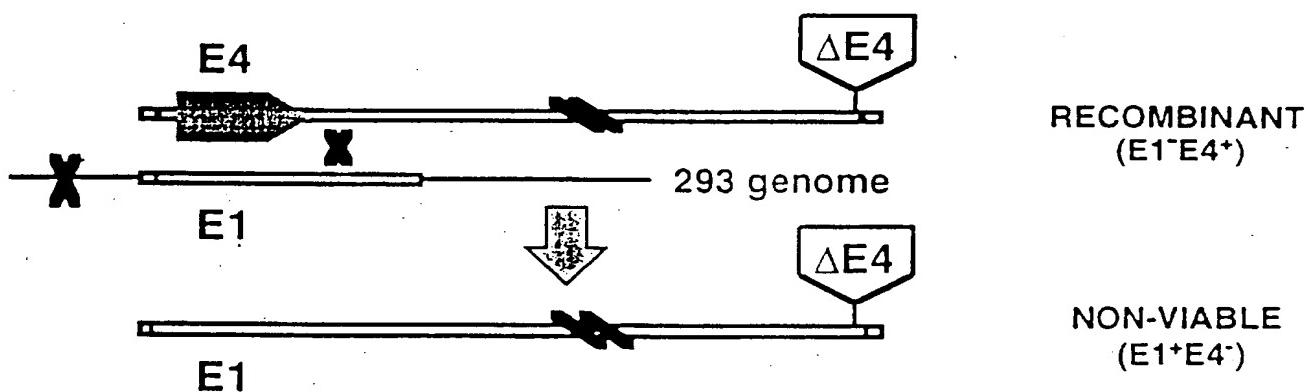
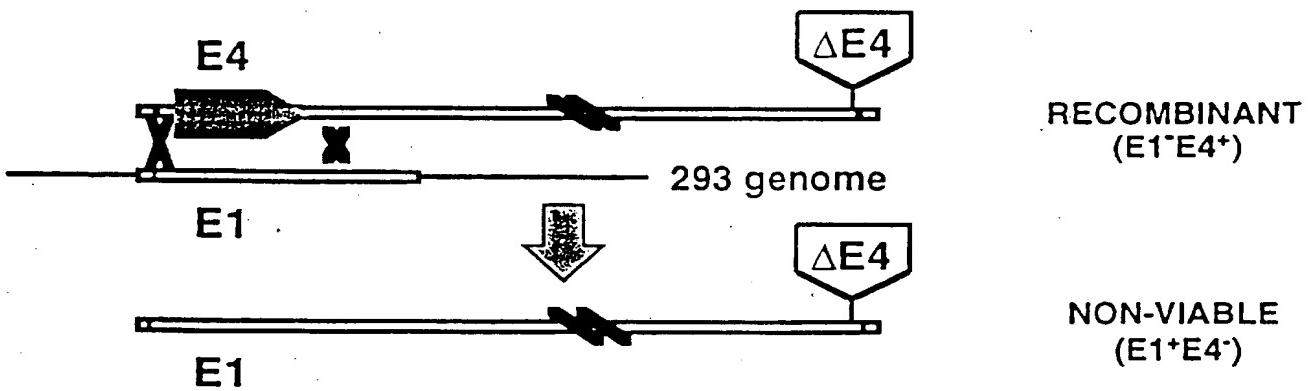
SINGLE RECOMBINATION AND CHROMOSOME BREAKAGE**DOUBLE RECOMBINATION**

Figure 3

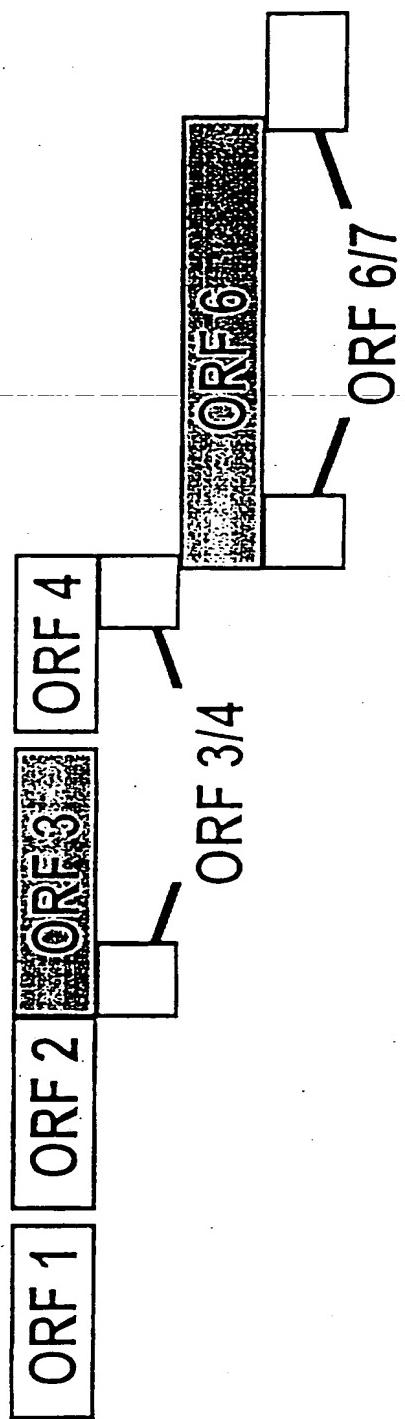


Figure 4

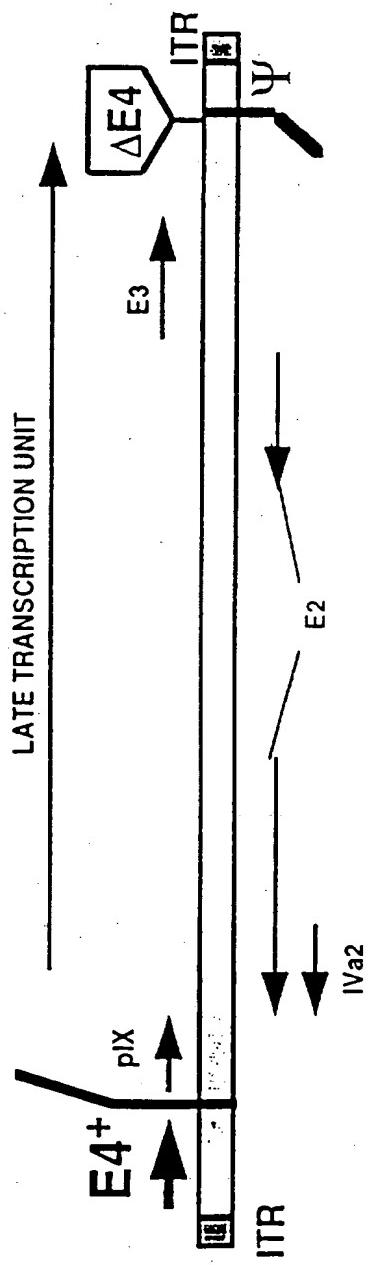


Figure 5

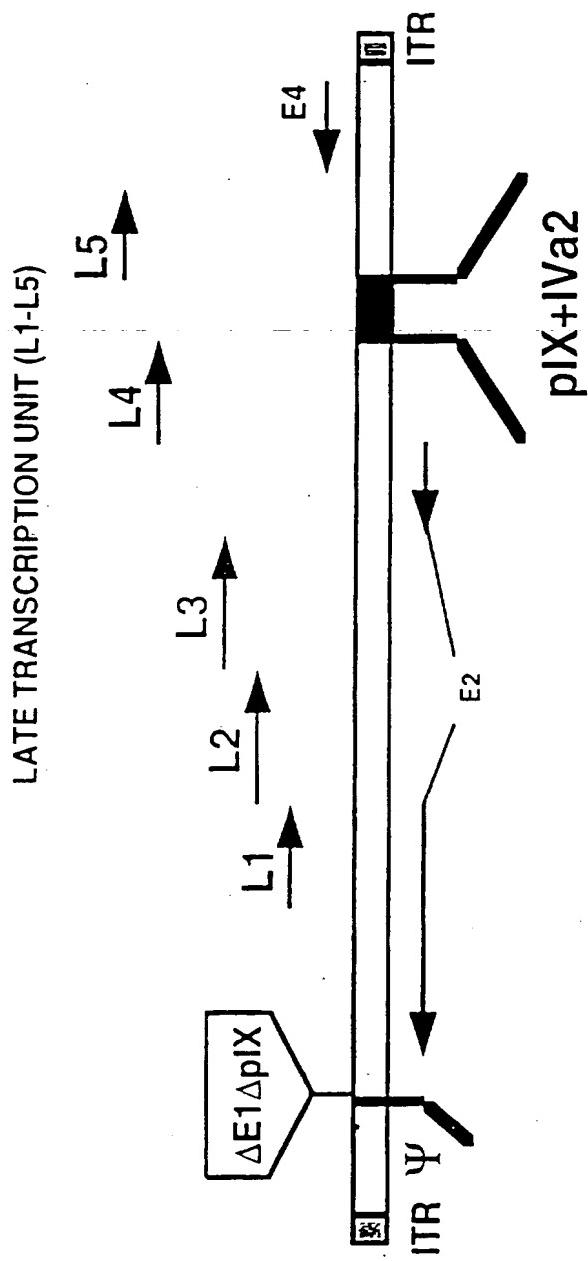
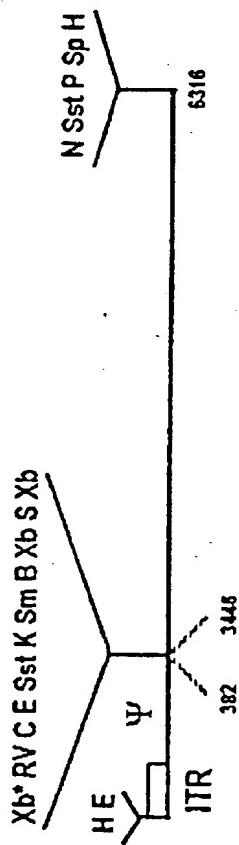
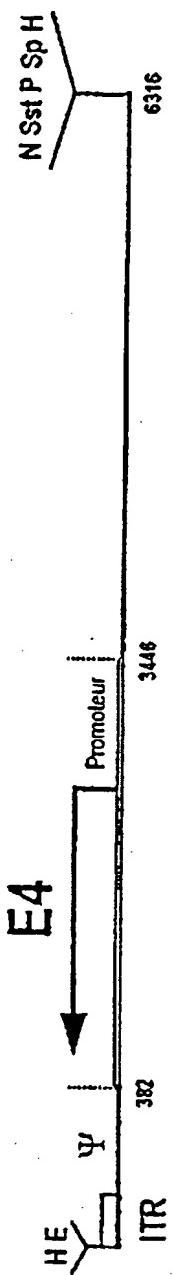
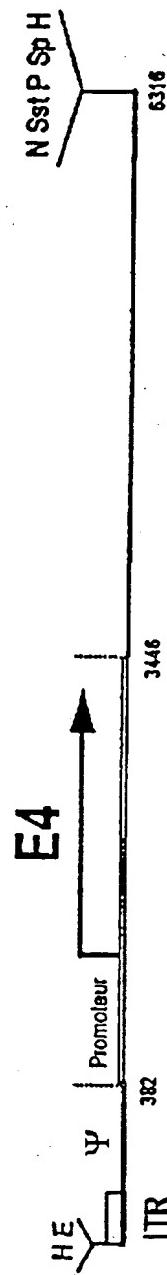
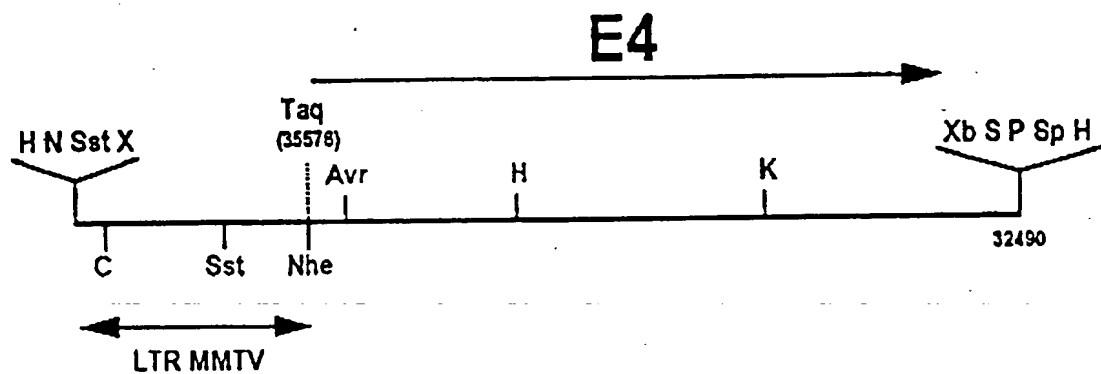


Figure 6

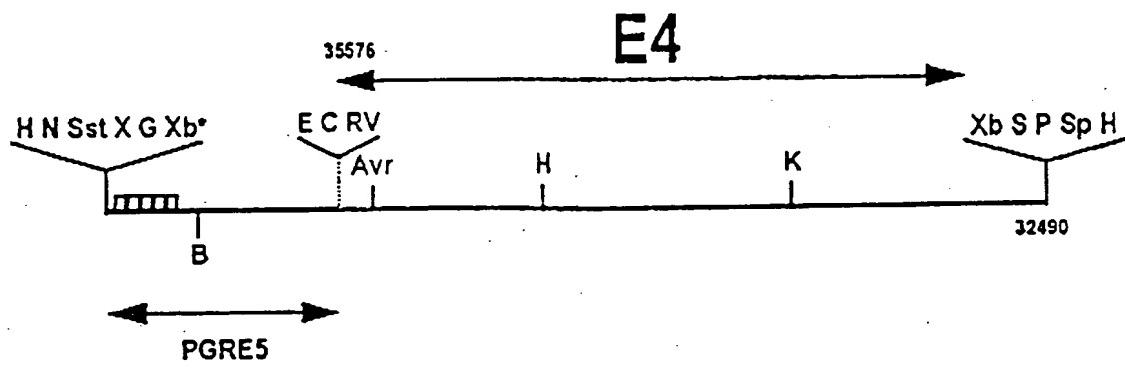
7/23

**pCO1****pCO1-E4**

8/23

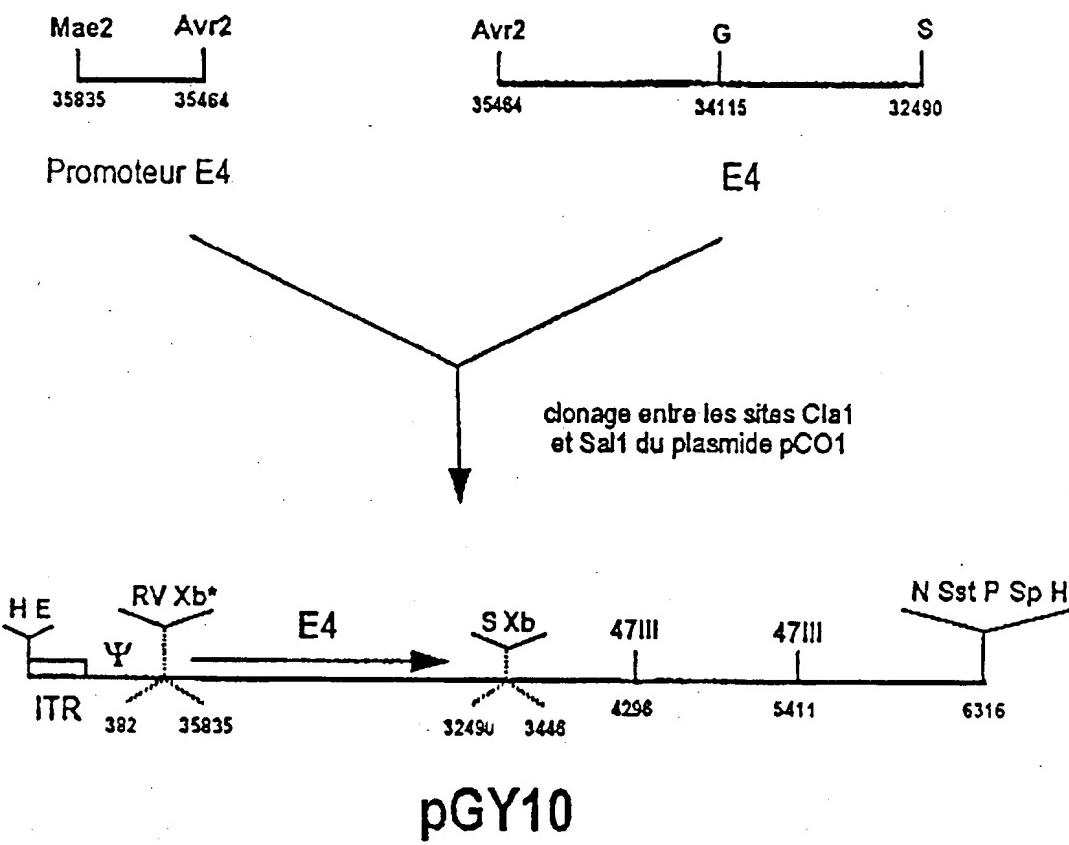


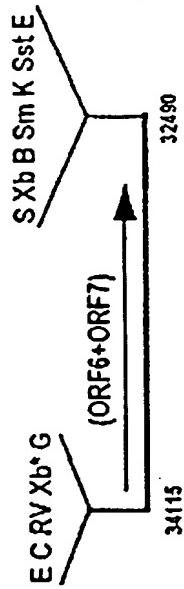
pPY6



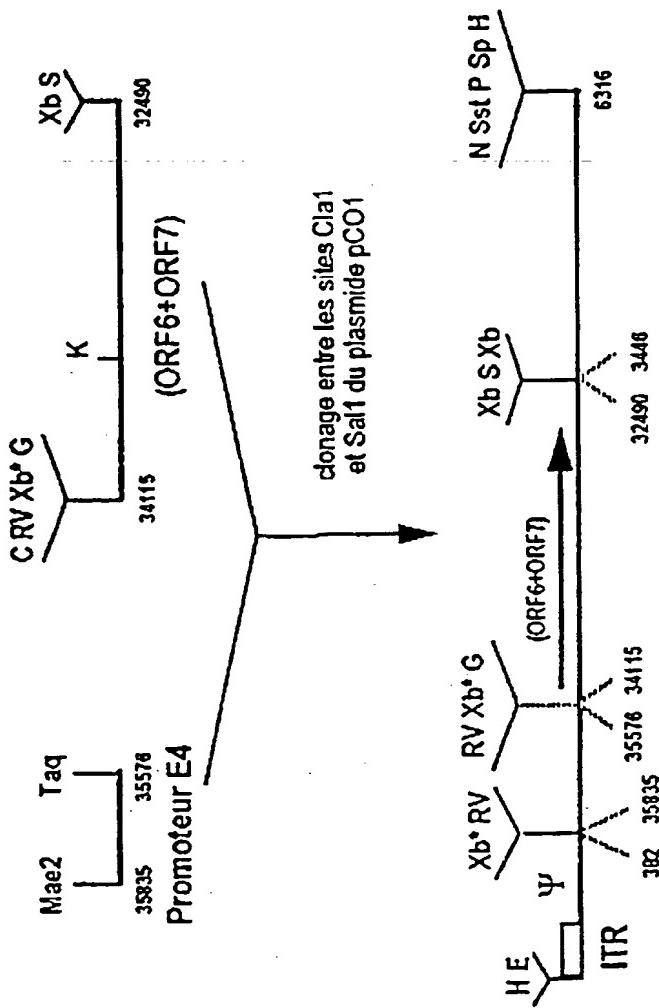
pPY40

9/23



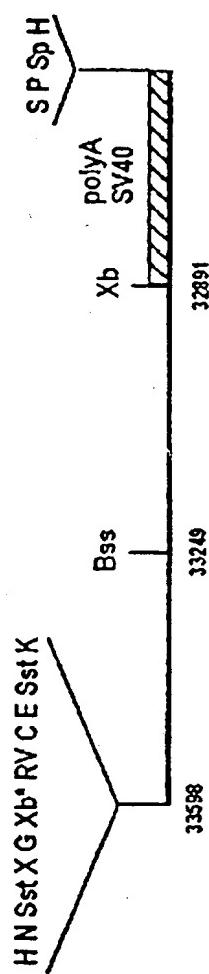
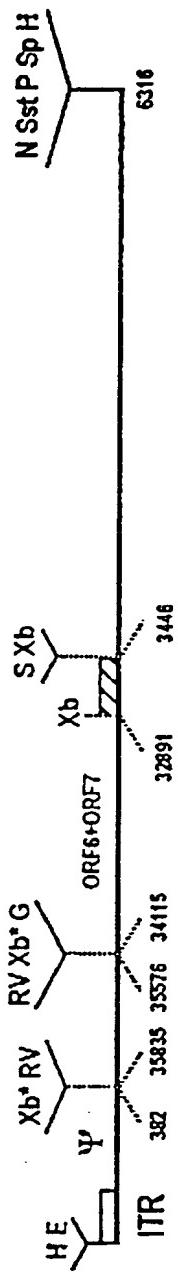


pGY47'

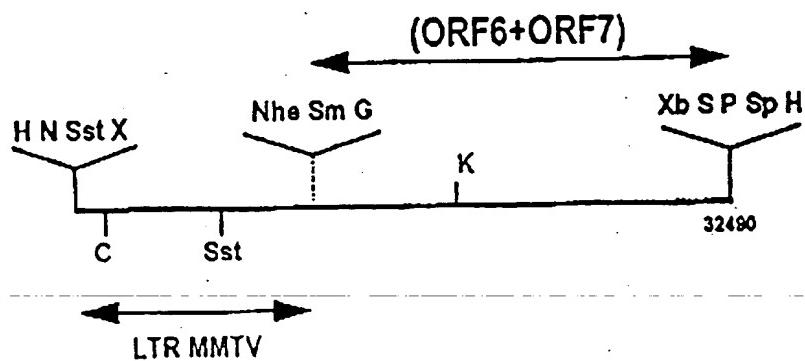


pC01-(ORF6+ORF7)

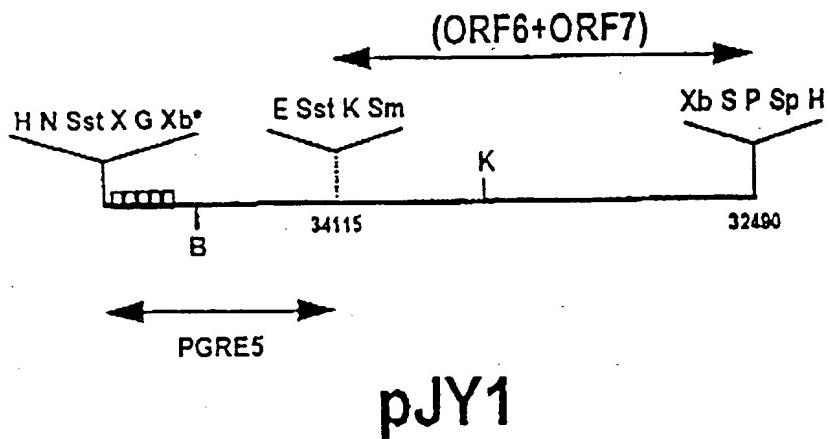
11/23

**pPY77****pPY78**

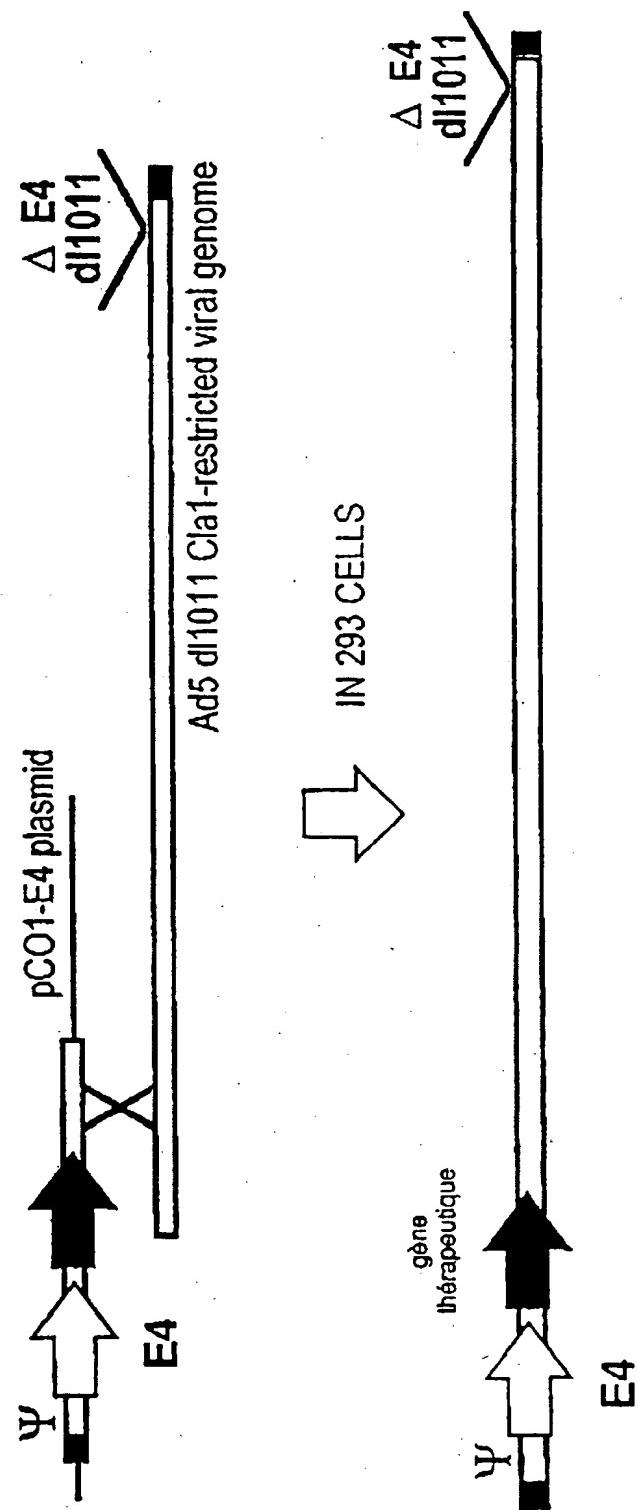
12/23



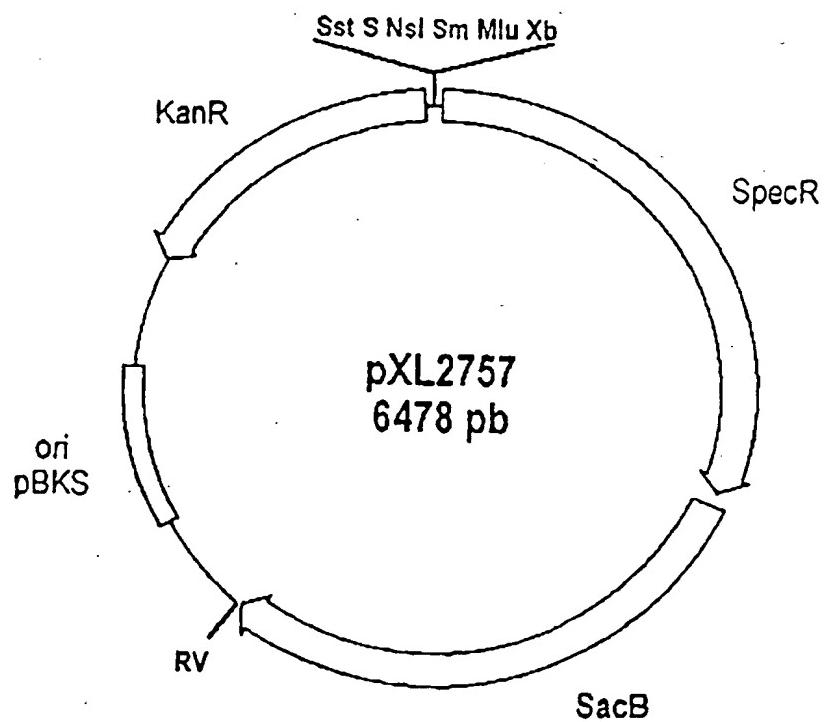
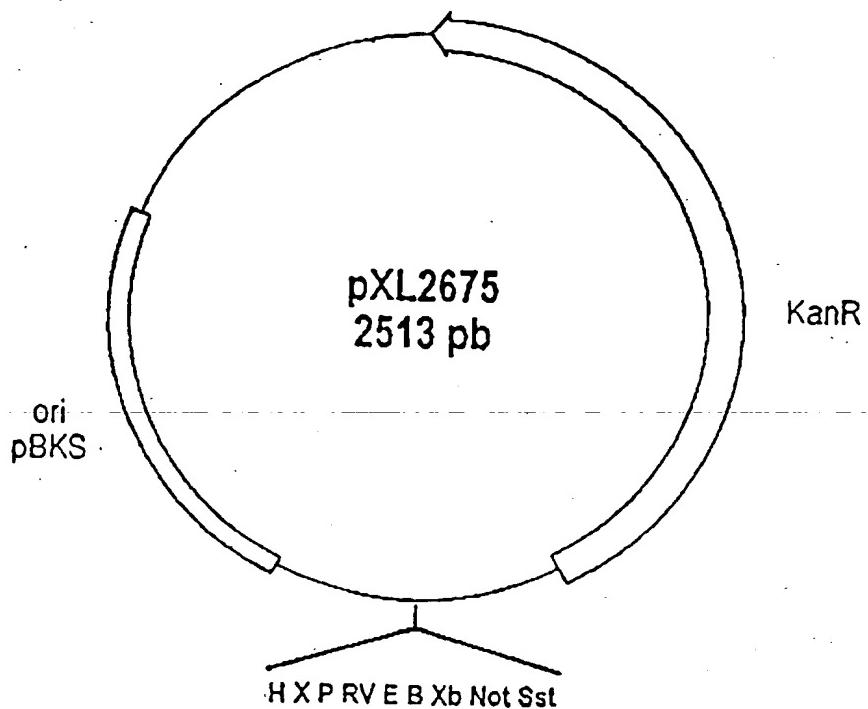
pPY15



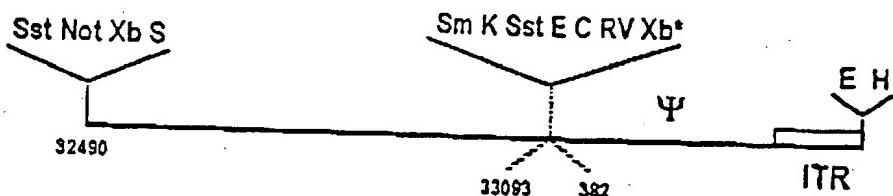
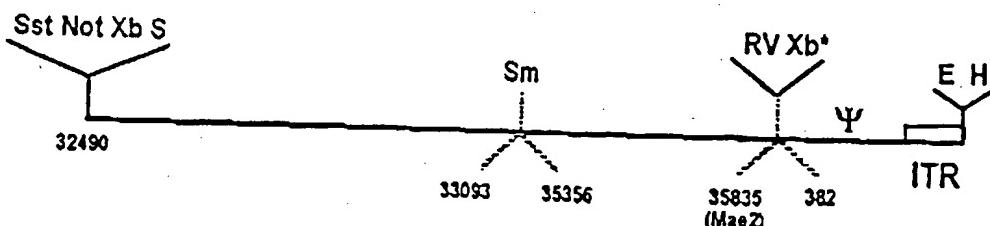
pJY1



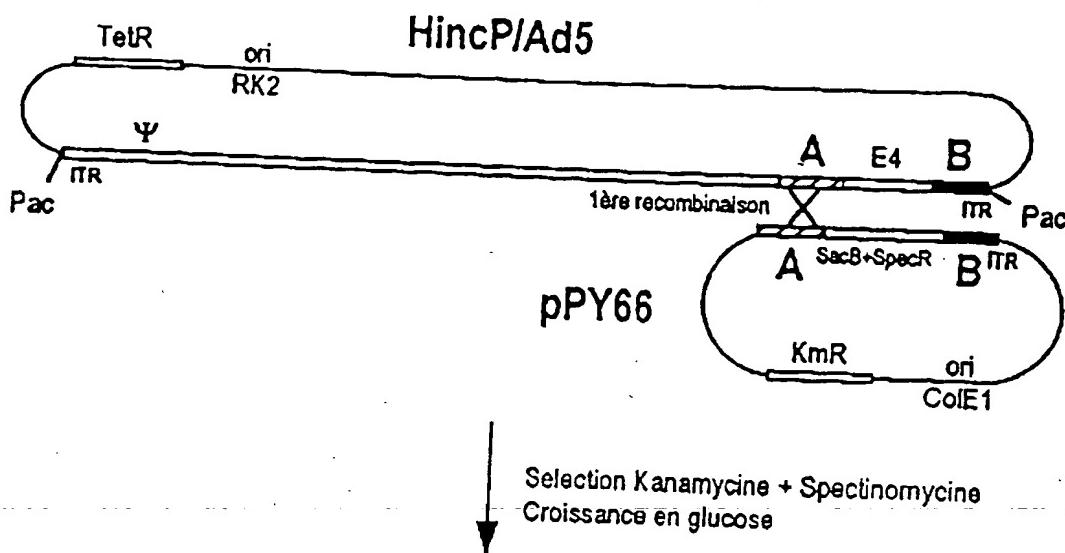
14/23



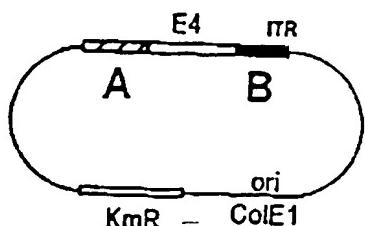
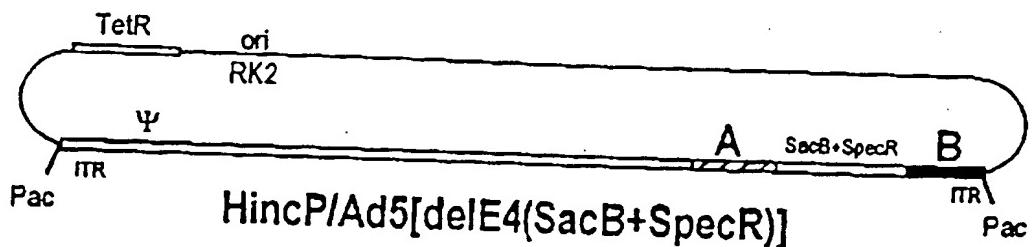
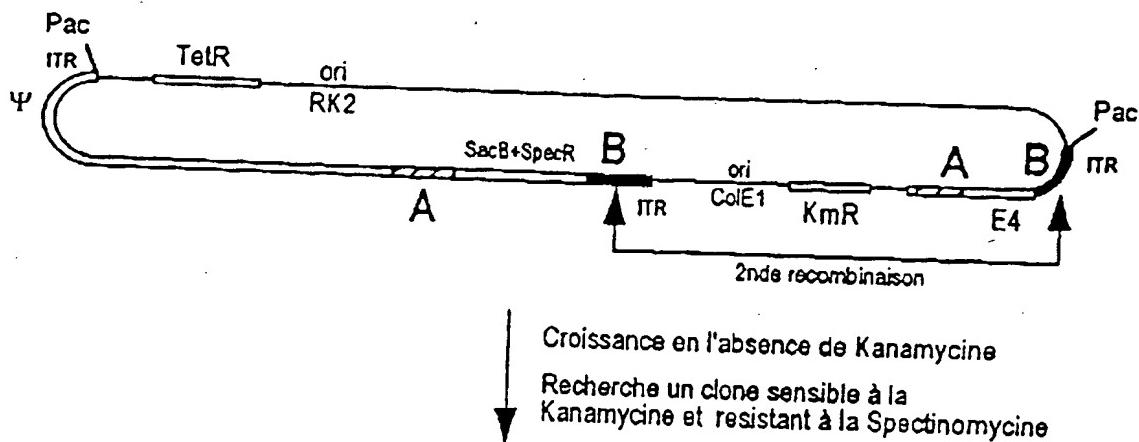
15/23

**pPY66****pPY82****pPY75**

16/23

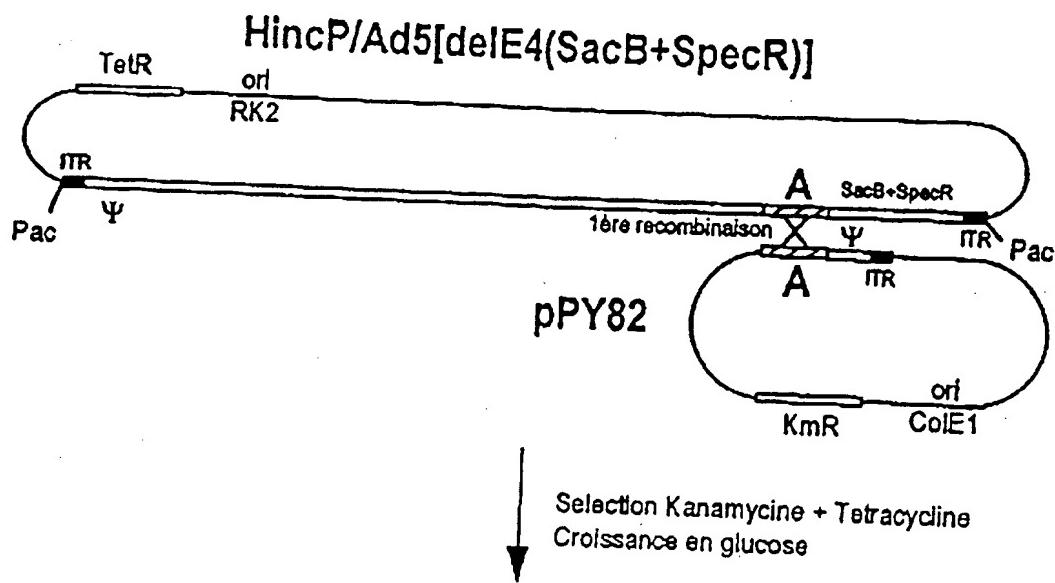


Fusion des réplicons

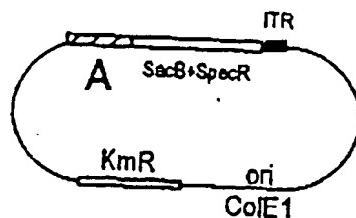
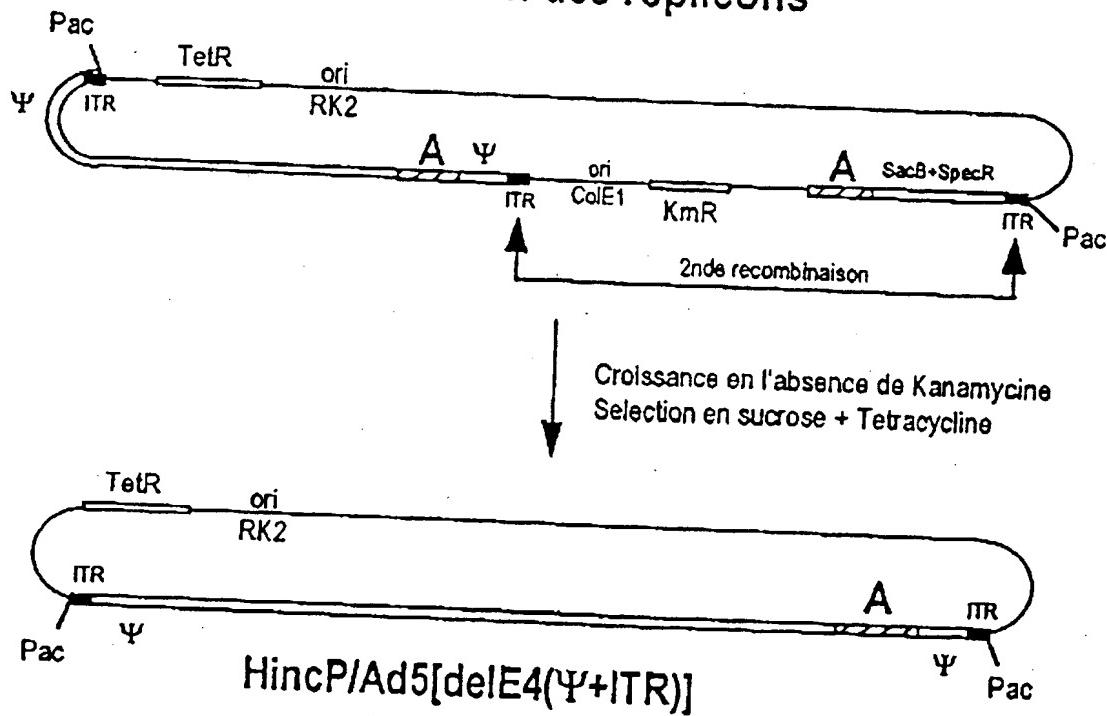


Réplicon ColE1
non fonctionnel chez
E. coli *pO1A*

17/23

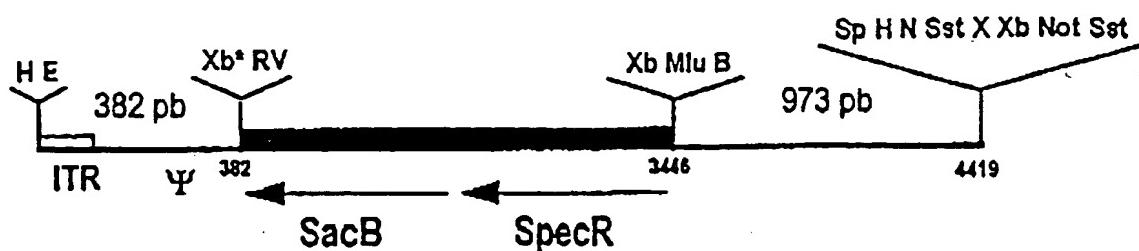


Fusion des réplicons

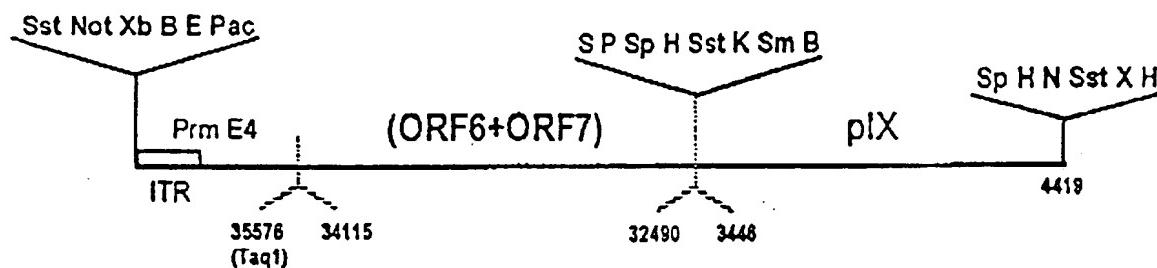


Réplicon ColE1

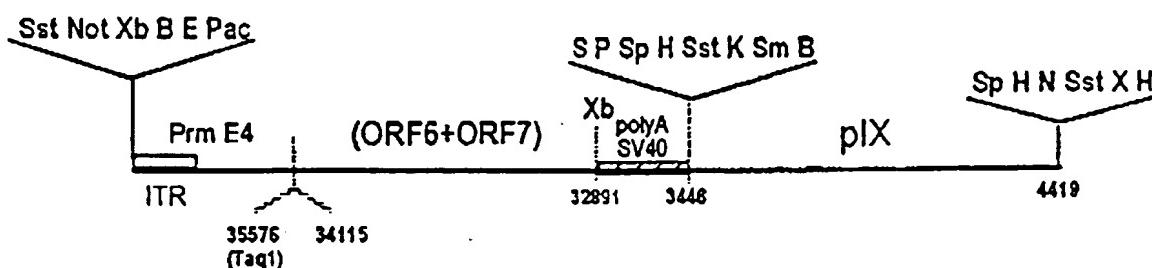
non fonctionnel chez
E. coli polA



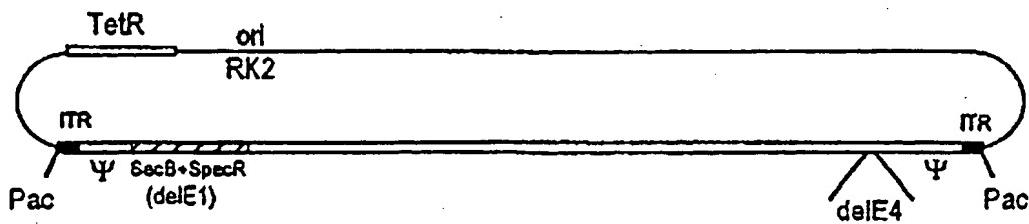
pPY88



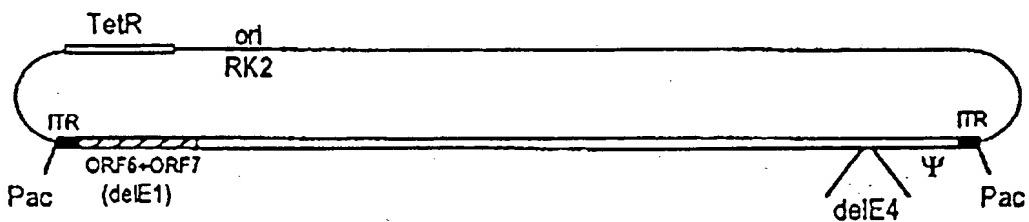
pGY50'



pPY90'

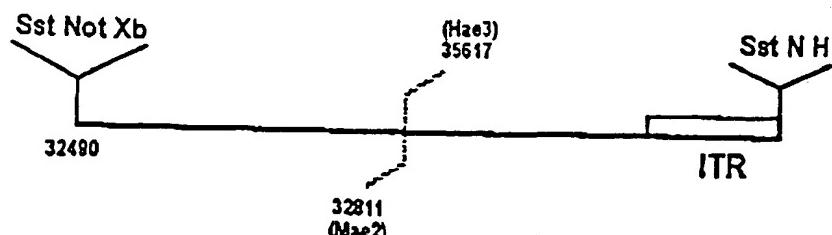


HincP/Ad5[ITRΨdelE1(SacB+SpecR)delE4(Ψ+ITR)]

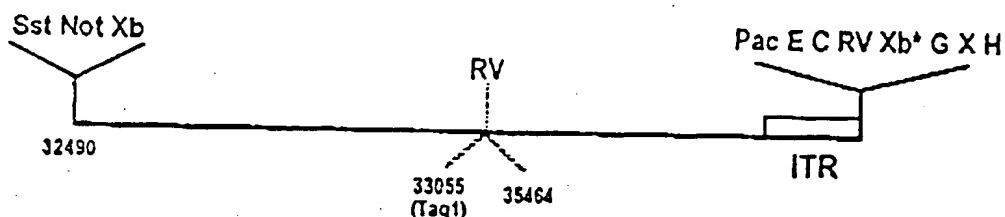


HincP/Ad5[ITRΔΨdelE1(ORF6+ORF7)delE4(Ψ+ITR)]

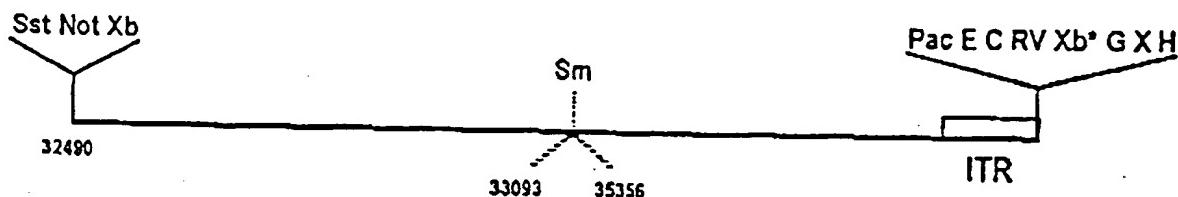
20/23



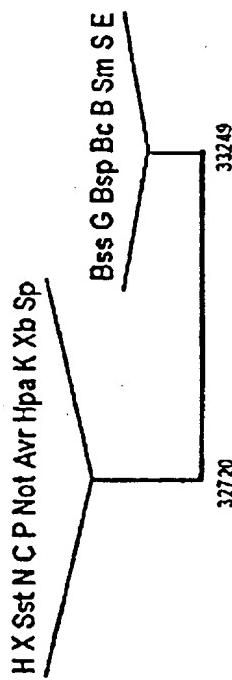
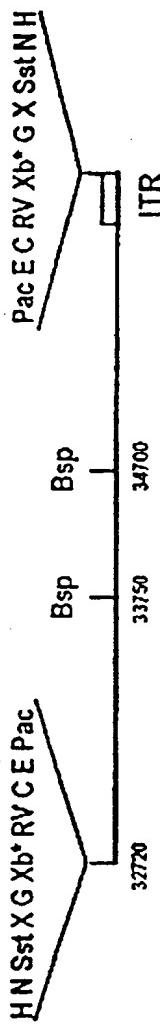
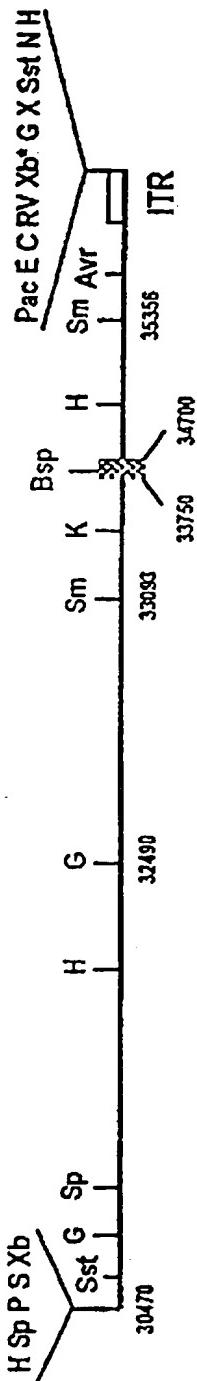
pPY70

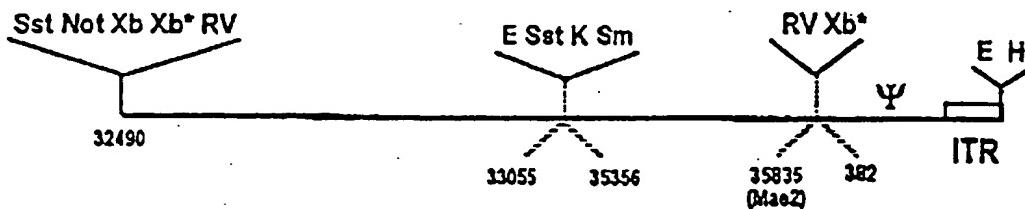


pPY71

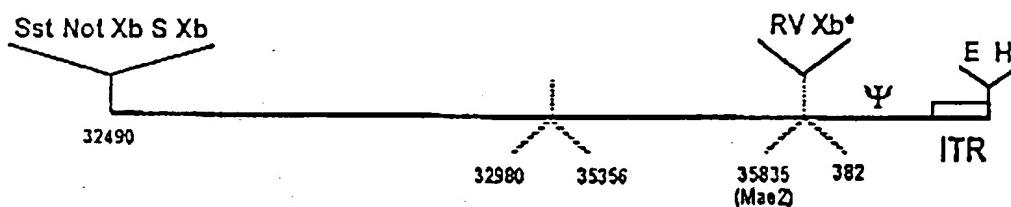


pPY72

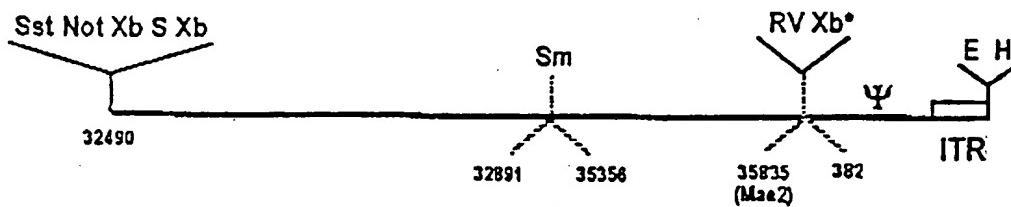
**pGY12****pGY14**



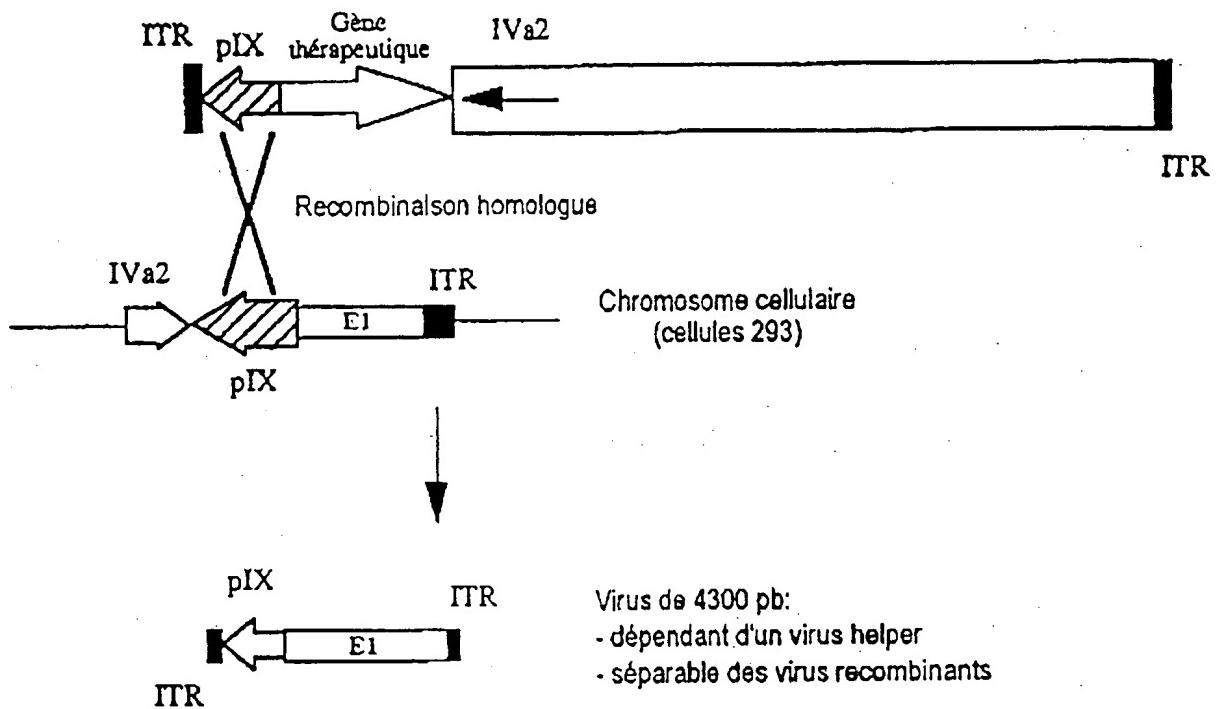
pPY91



pPY94



pPY92



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/FR 95/01415

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N7/01

A61K48/00 C07K14/075

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 24297 (CNRS. INSTITUT GUSZAVE ROUSSY. RHONE-POULENC RORER) 27 October 1994 see the whole document ---	1
P,A	WO,A,94 26914 (RHONE-POULENC RORER) 24 November 1994 see page 4, line 9 - line 13; claims 16,17 ---	1
P,A	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 December 1994 see claims --- -/-	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 1996

Date of mailing of the international search report

25 MARCH 1996

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 95/01415

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 2, February 1993 pages 918-927, WANG, Q. & TAYLOR, M.W. 'Correction of a deletion mutant by gene targeting with an adenovirus vector' see the whole document ---	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 10, October 1993 pages 5911-5921, BETT, A.J. ET AL. 'Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors' see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information about patent family members

International application No

PCT/FR 95/01415

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A-	2704234	28-10-94
		AU-B-	6572194	08-11-94
		CA-A-	2158869	27-10-94
		FI-A-	954966	18-10-95
		NO-A-	954132	17-10-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9426914	24-11-94	FR-A-	2705361	25-11-94
		AU-B-	6787894	12-12-94
		NO-A-	954466	07-11-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A-	2705686	02-12-94
		AU-B-	6850394	20-12-94
		CA-A-	2141212	08-12-94
		EP-A-	0652968	17-05-95
		JP-T-	7509616	26-10-95
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

International No
PCT/FR 95/01415

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N7/01

A61K48/00 C07K14/075

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS.

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,94 24297 (CNRS. INSTITUT GUSZAVE ROUSSY. RHONE-POULENC RORER) 27 Octobre 1994 voir le document en entier ---	1
P,A	WO,A,94 26914 (RHONE-POULENC RORER) 24 Novembre 1994 voir page 4, ligne 9 - ligne 13; revendications 16,17 ---	1
P,A	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 Décembre 1994 voir revendications --- -/-	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25. 03. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01415

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 2, Février 1993 pages 918-927, WANG, Q. & TAYLOR, M.W. 'Correction of a deletion mutant by gene targeting with an adenovirus vector' voir le document en entier ---	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 10, Octobre 1993 pages 5911-5921, BETT, A.J. ET AL. 'Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors' voir le document en entier ----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 95/01415

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234 AU-B- 6572194 CA-A- 2158869 FI-A- 954966 NO-A- 954132	28-10-94 08-11-94 27-10-94 18-10-95 17-10-95
WO-A-9426914	24-11-94	FR-A- 2705361 AU-B- 6787894 NO-A- 954466	25-11-94 12-12-94 07-11-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686 AU-B- 6850394 CA-A- 2141212 EP-A- 0652968 JP-T- 7509616	02-12-94 20-12-94 08-12-94 17-05-95 26-10-95